

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS PESQUEIRAS NOS TRÓPICOS

DAMY CAROLINE DE MELO SOUZA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL DE TAMBAQUI, *Colossoma
macropomum* INFECTADO PELO ACANTOCÉFALO *Neoechinorhynchus
buttnerae***

MANAUS
2019

DAMY CAROLINE DE MELO SOUZA

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL DE TAMBAQUI, *Colossoma macropomum*, INFECTADO PELO ACANTOCÉFALO *Neoechinorhynchus buttnerae*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos - CIPET, da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, área de concentração: Uso Sustentável de Recursos Pesqueiros Tropicais.

Orientador (a): Dra. Edsandra Campos Chagas

Coorientador (a): Dra. Maria Cristina dos Santos

MANAUS

2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S729a Souza, Damy Caroline de Melo
Avaliação da resposta humoral de tambaqui, *Colossoma macropomum*, infectado pelo acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae* / Damy Caroline de Melo Souza. 2019
97 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Edsandra Campos Chagas
Coorientadora: Maria Cristina dos Santos
Tese (Mestrado em Ciências Pesqueiras nos Trópicos) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. imunidade. 2. parasito. 3. teleósteo. 4. aquicultura. 5. anticorpo.
I. Chagas, Edsandra Campos II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título

DAMY CAROLINE DE MELO SOUZA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL DE
TAMBAQUI, *Colossoma macropomum* INFECTADO PELO
ACANTOCÉFALO *Neoechinorhynchus buttnerae***

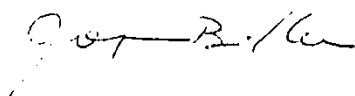
Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, área de concentração em Uso Sustentável de Recursos Pesqueiros Tropicais.

Aprovado em 23 de Agosto de 2019

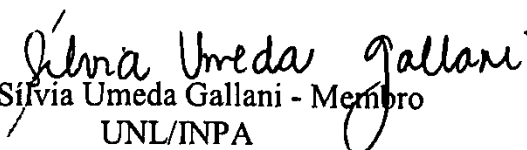
BANCA EXAMINADORA



Dra. Edsandra Campos Chagas - Presidente
EMBRAPA



Dra. Jaqueline Biller - Membro
UNESP



Dra. Sílvia Umeda Gallani - Membro
UNL/INPA

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meu melhor amigo e ajudador, que sempre me sustentou e compartilhou um pouco da sua infinita sabedoria comigo desde a elaboração deste projeto até sua conclusão. Te agradeço imensamente pelo seu amor e cuidado sempre presente na minha vida.

À minha família, minha base em todos os momentos. Eu agradeço imensamente pelos abraços apertados, pelo enxugar das lágrimas, por acreditar e compartilhar dos meus sonhos, pelo consolo em dias difíceis e serem os motivos dos meus melhores sorrisos. Vocês são meu abrigo. Agradeço a meu pai e minha mãe por sempre estarem dispostos a me ensinar e me compreender, transbordando amor na minha vida. Eu amo vocês. Agradeço a minha irmã Heide por ser minha melhor amiga que sempre me traz o sorriso ao rosto e me impulsiona a acreditar em mim mesma.

Aos meus amigos da igreja, em especial, a célula Pedras Vivas por estarem sempre me apoiando mesmo sem saber muito do que todo esse projeto se tratava e sempre me lembrarem que Deus está perto de nós, sempre pronto a nos ouvir. Obrigada pelos abraços, pelo carinho, por orarem por mim e compartilhar muitos momentos de alegria verdadeira.

Aos meus amigos do mestrado, a turma de 2018/1 por me proporcionarem momentos muito divertidos e compartilharem os momentos de desespero. Agradeço aos meus amigos Octávio e Marcos pela ajuda sempre que precisei e amizade que espero levar para vida. Agradeço especialmente ao Diego, por ser o primeiro revisor de todos os meus textos, ouvir minhas ideias mais mirabolantes e histórias sem sentido. Obrigada pela sua amizade incrível que me acompanhou nos dias bons e ruins. Obrigada mesmo!

À minha orientadora Dra. Edsandra Campos Chagas por seu apoio e, desde o início, o estímulo ao pensamento científico pessoal. A senhora me inspirou e ensinou de muitas formas. Ensinaamentos que levarei para minha vida pessoal e profissional. Muito obrigada pela paciência e amizade, por acreditar no nosso projeto e sempre ser excelente em sua orientação. Agradeço mesmo pela oportunidade de ter sido orientada pela senhora e espero que possamos continuar contribuindo juntas!

À minha coorientadora Dra. Maria Cristina dos Santos. A senhora me ensinou que a vida acadêmica pode e deve ser muito mais que produtividade. Que a ciência deve ser feita com qualidade e que no percurso é possível criar laços verdadeiros com as pessoas ao nosso redor. Eu agradeço muito pelos seus conselhos e incríveis ideias quando eu já pensava ter chegado a

um limite. Obrigada por abrir as portas do seu laboratório e abraçar nosso projeto. Vou levar seu exemplo para minha vida.

Aos meus amigos da Embrapa por toda a cooperação e pelo compartilhamento de boas lembranças. Especialmente ao Franmir e à professora Maria Inês, agradeço imensamente pela cooperação nos dias de trabalho e conversas engraçadas que tornavam tudo mais leve e divertido. Obrigada por estarem comigo, me aconselharem e pela oportunidade de aprender com vocês também.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia por me receberem de braços abertos e logo me incluírem em todo esse carinho que vocês transbordam. Aprendi muito com vocês e espero que nossa amizade continue por toda vida. Obrigada especialmente ao Rafael por dedicar seu tempo em me ensinar a eletroforese e ser uma pessoa a se inspirar. É sempre bom encontrar pessoas calmas na estrada estressante da pós-graduação. Obrigada, também, a Gil por me ajudar nas técnicas de ELISA e a Luana, pelas incríveis histórias engraçadas.

Aos amigos da graduação por estarem sempre torcendo por mim. Nossos reencontros são sempre especiais para mim e, apesar de não conseguirmos mais estar tão próximos, eu posso sentir o carinho de vocês. Amo vocês.

Aos meus amigos da veterinária na ESBAM, em especial à Bibiane, Mara e João por me ajudarem e me estimularem a continuar. A amizade de vocês foi essencial nos dias ruins e quando estava muito cansada. Obrigada mesmo pelo apoio e incentivo.

Aos membros da banca examinadora da aula de qualificação: Dr. Oscar Tadeu Ferreira da Costa e Dra. Sanny Maria de Andrade Porto, pelas contribuições ao projeto de pesquisa e ao estímulo para seguir em frente nos desafios que foram propostos.

Aos membros da banca examinadora de defesa de dissertação: Dra. Jaqueline Dalbello Biller Takahashi e Dra. Silvia Umeda Gallani por ter aceitado o convite e pelas contribuições ao trabalho.

À Capes, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão de bolsa durante parte do mestrado.

À Universidade Federal do Amazonas, pela oportunidade de capacitação profissional e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos (PPG-CIPET).

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária pela oportunidade oferecida e financiamento para este projeto.

RESUMO GERAL

Este estudo avaliou a resposta imune humoral local e sistêmica do *Colossoma macropomum* à infecção pelo acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae*, um parasito recorrente no cultivo de tambaqui que tem ocasionado prejuízos às pisciculturas, especialmente na região Norte do Brasil. Primeiramente, realizou-se uma revisão de literatura para constatação das principais respostas nos peixes teleósteos à infecção por parasitos helmintos. Como resultado, observou-se que o aumento do número e tamanho de células produtoras de muco é a resposta mais comum em quase todas as espécies investigadas. As células rodlets e mastócitos, juntamente com neutrófilos e macrófagos estão frequentemente associadas com a presença de helmintos nas mucosas, principalmente intestinal. A participação do sistema imune adaptativo na defesa e eliminação de helmintos ainda é um campo pouco explorado devido às dificuldades metodológicas e ao maior enfoque dado ao sistema imune inato dos peixes. Apesar disso, as novas descobertas caracterizando diferenças nas respostas imunes locais e sistêmicas tem estimulado novas pesquisas direcionadas ao sistema imune adaptativo dos peixes em infecções por helmintos. Propôs-se, então, a adaptação de um método já estabelecido para purificação e isolamento de imunoglobulinas em mamíferos, a fim de facilitar o estudo dessas moléculas, principalmente em espécies nativas. A purificação de imunoglobulinas da mucosa intestinal pelo método do ácido caprílico foi realizada em 10 tambaquis infectados e 10 tambaquis não infectados. Isolou-se parcialmente algumas classes de imunoglobulinas, porém a metodologia ainda precisa ser ajustada para atingir maior grau de pureza, verificada pela eletroforese SDS-PAGE. Ainda assim, esta técnica mostra-se mais simples e apresenta menor custo comparada às outras técnicas de purificação comumente utilizadas. No *western blot* foi possível detectar imunoglobulinas presentes no muco com anticorpos anti-Ig totais séricos, indicando a presença de classe (s) similar (es) nos dois fluidos corpóreos do tambaqui. A infecção pelo acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae* resultou na maior expressão de imunoglobulinas no muco intestinal, apresentado maior títulos de imunoglobulinas nos animais infectados. Em um segundo experimento, 10 tambaquis infectados e 10 tambaquis não infectados em duas classes de peso diferentes foram separados, coletando-se soro e muco intestinal para a avaliação de componentes da resposta imune inata e adaptativa. A imunohistoquímica do intestino de tambaqui infectados e não infectados foi realizada a fim de confirmar a presença das imunoglobulinas na mucosa intestinal e a interação dessas moléculas com o acantocéfalo. Foi observado o aumento dos títulos de imunoglobulinas totais e fosfatase alcalina no soro, assim como dos níveis de proteínas totais no soro e no muco, e a

diminuição dos títulos de imunoglobulinas e fosfatase alcalina no muco intestinal dos animais infectados. A presença de imunoglobulinas em células presentes na lâmina própria de animais não infectados, no muco intestinal e em contato direto com a superfície do parasito nos animais infectados foi revelada pela imunohistoquímica. Assim, nas infecções por acantocéfalos, observa-se respostas locais e sistêmicas do sistema imune do tambaqui, evidenciando a importância do muco para avaliação de alterações locais e do soro para avaliar o estado de saúde do peixe.

ABSTRACT

This study evaluated the local and systemic humoral immune response of *Colossoma macropomum* to infection by acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae*, a recurrent parasite in tambaqui cultivation that has caused losses to fish farms, especially in Brazil northern region. First, a literature review was performed to find out the main responses in teleost fish to helminth parasite infection. As a result, it was observed that increasing the number and size of mucus producing cells is the most common response in almost all species investigated. Rodlet cells and mast cells, together with neutrophils and macrophages are often associated with the presence of helminths in the mucosa, especially intestinal mucosa. The role of the adaptive immune system in helminth defense and elimination is still a poorly explored field due to methodological difficulties and the increased focus on the innate immune system of fish. Nevertheless, new findings characterizing differences in local and systemic immune responses have stimulated further research targeting the adaptive immune system of fish in helminth infections. Therefore, it was proposed an adaptation of an established method for the purification and isolation of immunoglobulins in mammals, in order to facilitate the study of these molecules, especially in native species. Purification of intestinal mucosal immunoglobulins by the caprylic acid method was performed on 10 infected and 10 uninfected tambaqui. Some classes of immunoglobulins have been partially isolated, but the methodology still needs to be adjusted to achieve the highest purity, verified by SDS-PAGE electrophoresis. Still, this technique is simpler and less expensive compared to other commonly used purification techniques. In western blot, it was possible to detect immunoglobulins present in the mucus with serum total anti-Ig antibodies, indicating the presence of equal class (es) in both tambaqui body fluids. Acanthocephalan infection *Neoechinorhynchus buttnerae* resulted in higher immunoglobulin expression in the intestinal mucus, presenting higher immunoglobulin titers in infected animals. In a second experiment, 10 infected and 10 uninfected tambaquis in two different weight classes were separated. Serum and intestinal mucus were collected for evaluation of innate and adaptive immune response components. Intestinal immunohistochemistry of infected and uninfected tambaqui was performed to confirm the presence of immunoglobulins in the intestinal mucosa and the interaction of these molecules with acanthocephalan. Increases in total immunoglobulin and alkaline phosphatase titers were observed, as well as in serum and mucus total protein levels, and decreased immunoglobulin and alkaline phosphatase titers in the intestinal mucus of infected animals. The presence of immunoglobulins in cells present in the lamina propria of

uninfected animals and immunoglobulins in intestinal mucus and in direct contact with the parasite surface was revealed by immunohistochemistry. Thus, in acanthocephalan infections, local and systemic responses of the tambaqui immune system are observed, highlighting the importance of mucus for the evaluation of local alterations and serum to assess the health status of the fish.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figure 1. Fish immune response to parasite helminths.....	28
--	----

Capítulo 2

Figura 1. Gel de eletroforese de <i>Colossoma macropomum</i> . A) Amostras com muco intestinal íntegro: MIA - amostra dos animais infectados sem redução; MIB - amostra dos animais infectados com redução; MNA - amostra dos animais não infectados sem redução; MNB – amostra dos animais não infectados com redução. B) Amostras com muco purificado por ácido caprílico: PIA - amostra dos animais infectados sem redução; PIB - amostra dos animais infectados com redução; PNA - amostra dos animais não infectados sem redução; PNB – amostra dos animais não infectados com redução. Classe de Ig isolada que sofreu evidente dissociação devido à redução com 2-mercaptoetanol (cabeça de seta).	53
--	----

Figura 2. Western blot de muco de <i>Colossoma macropomum</i> marcado com anticorpo anti-Ig totais séricas de <i>C. macropomum</i> . Amostras com muco purificado por ácido caprílico: PIA - amostra dos animais infectados sem redução; PIB - amostra dos animais infectados com redução; PNA - amostra dos animais não infectados sem redução; PNB – amostra dos animais não infectados com redução. A cabeça de seta mostra a classe de Ig isolada tanto no tambaqui infectado e não infectado sofreu evidente dissociação em cadeia pesada (*) e cadeia leve devido à redução com 2-mercaptoetanol. Anticorpo de camundongo anti-Ig totais séricas de tambaqui mostrou reatividade com as imunoglobulinas do muco de tambaqui.....	54
---	----

Figura 3. Título de imunoglobulinas totais no muco intestinal de <i>Colossoma macropomum</i> não-infectados (N) e infectados (I) por <i>Neoechinorhynchus buttnerae</i> (Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$)	55
---	----

Capítulo 3

Figura 1. <i>End-points</i> das diluições seriadas das imunoglobulinas totais no soro e no muco de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>). N = animais não infectados, I = animais infectados. * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).	86
--	----

Figura 2. Comparação da reação na camada mucosa do intestino de <i>Colossoma macropomum</i> não infectado (A) e infectado por <i>Neoechinorhynchus buttnerae</i> (B) tratados com imunoglobulina de camundongo anti-imunoglobulinas de tambaqui. A coloração vermelha-amarronzada revela a presença de imunoglobulinas. A. Intestino não infectado apresentando vilo intacto e reação positiva nas células presentes na lâmina própria (cabeça de seta). B. Intestino infectado mostrando compressão do vilo pelo corpo do parasito (asterisco) e reação positiva nas células presentes na lâmina própria (cabeça de seta preta), no muco (seta fina) e na superfície corporal do acantocéfalo (cabeça de seta branca).	87
--	----

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Table 1. Immune components of fish associated with responses to parasite helminths	34
---	----

Capítulo 3

Tabela 1. Média \pm desvio padrão dos níveis de alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP) e proteínas totais (PTT) presentes no soro e no muco de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) não infectados e infectados por <i>Neoechinorhynchus buttnerae</i> em diferentes classes de peso.	85
---	----

Tabela 2. Correlação entre diferentes parâmetros no soro e muco de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) não infectados e infectados por <i>Neoechinorhynchus buttnerae</i>	85
--	----

Tabela 3. Índices parasitários de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) infectados por <i>Neoechinorhynchus buttnerae</i> em diferentes classes de peso.	87
---	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	15
REFERÊNCIAS.....	17
Capítulo I.....	20
Immune response of teleost fish to helminth parasite infection	21
Introduction	22
Immune system of teleost fish.....	22
<i>Fish innate immune system.....</i>	<i>23</i>
<i>Fish adaptive immune system.....</i>	<i>23</i>
<i>Immune organs</i>	<i>24</i>
<i>Fish Diseases and Triggering of the Immune Response.....</i>	<i>25</i>
Infection by helminths in teleost fish	26
Monogenea	28
Cestoda	30
Trematoda	31
Nematoda.....	32
Acanthocephala.....	33
Alternatives for Diagnosis of Helminth Infection in Fish	38
Final Remarks	39
References.....	40
Capítulo II	53
Purificação parcial e titulação de imunoglobulinas no plasma e no muco intestinal de <i>Colossoma macropomum</i> não infectados e infectados por <i>Neoechinorhynchus buttnerae</i>	54
1. Introdução.....	57
2. Material e métodos	59
2.1. Animais experimentais	59
2.2. Coleta do muco intestinal	59
2.3. Purificação das imunoglobulinas.....	59
2.4. Eletroforese em SDS – PAGE e Western blot.....	60
2.5. Titulação de imunoglobulinas	61
2.6. Análise parasitológica.....	62
2.7. Análise estatística	62
3. RESULTADOS	62
3.1. SDS-PAGE	62
3.2. Western blot.....	64

3.3. Titulação de imunoglobulinas do muco intestinal de <i>C. macropomum</i>	64
3.4 Análise parasitológica.....	65
4. Discussão	65
6. Referências	69
Capítulo III	75
Perfil da resposta imune humoral local e sistêmica em <i>Colossoma macropomum</i> infectado por <i>Neoechinorhynchus buttnerae</i>	76
1. Introdução	78
2. Material e métodos	80
2.1. Animais experimentais.....	80
2.2. Obtenção do soro	80
2.3. Coleta do muco intestinal	81
2.4. Quantificação das proteínas totais	81
2.5. Análises enzimáticas.....	81
2.6. Titulação das imunoglobulinas totais no soro e no muco.....	81
2.7. Imunohistoquímica	82
2.8. Análise parasitológica.....	83
2.9. Análise estatística	83
3. Resultados	84
3.1. Análises enzimáticas e proteínas totais	84
3.2. Títulos de imunoglobulinas totais presentes no soro e no muco	86
3.3. Análise imunohistoquímica	86
3.4. Análise parasitológica.....	87
4. Discussão	88
5. Referências	92
CONCLUSÃO GERAL	99

INTRODUÇÃO GERAL

A aquicultura é um setor em desenvolvimento no Brasil, sendo registrado de 2005 a 2015, um crescimento de 123% passando de 257 mil a 574 mil toneladas de pescado nesse período (FLORES et al., 2016). Os peixes de água doce correspondem a 84% da produção aquícola brasileira, sendo a tilápia (*Oreochromis niloticus*) e o tambaqui (*Colossoma macropomum*) responsáveis por 62% da produção no Brasil, em 2016 (IBGE, 2017). Dentre os diversos desafios para maior produtividade da aquicultura brasileira, a questão sanitária tem sido uma preocupação tanto para os consumidores que desejam um produto com qualidade quanto para o produtor que deseja evitar perdas devido ao aparecimento de doenças.

A intensificação dos sistemas de produção, o manejo inadequado e problemáticas quanto à manutenção da qualidade da água gerou aumento nos registros de mortalidade ocasionada por patógenos (DE SANT'ANA et al., 2012; LACERDA et al., 2012; VIDEIRA et al., 2016). A perda estimada para o setor aquícola brasileiro somente devido às doenças chega a 84 milhões de dólares/ano, sem contar a redução do potencial reprodutivo e o impacto negativo na conversão alimentar, diminuindo as taxas de crescimento (TAVARES-DIAS; MARTINS, 2017). O manejo adotado, tais como a qualidade e quantidade de alimento, baixos níveis de oxigênio na água e a fonte da água usada para suprir os tanques contribuem para o estresse dos animais tornando-os suscetíveis para a infecção e disseminação de doenças infecto-parasitárias (DIAS et al., 2015).

O tambaqui é uma espécie nativa da Bacia Amazônica, sendo a principal espécie nativa cultivada no Brasil, representando, aproximadamente, 18% da produção total de peixes (IBGE, 2017). Nas pisciculturas, observa-se o aumento dos registros de doenças conforme se intensifica o cultivo desta espécie, resultando em prejuízos para os produtores seja pela mortalidade ou pela menor conversão alimentar dos peixes (MALTA et al., 2001; SANTOS et al., 2013; TAVARES-DIAS et al., 2011; VIDEIRA et al., 2016). Na região Norte, dentre as diversas doenças reportadas, as infecções em tambaqui pelo acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae* tem aumentado, sendo o primeiro registro de alta infecção feito por MALTA et al. (2001) em região próxima a Manaus – AM. Atualmente, há registro de infecções por *N. buttnerae* em outros estados da região Norte e Nordeste (CHAGAS et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015; LOURENÇO et al., 2017; PEREIRA; MOREY, 2018).

As principais contribuições dos estudos sobre o sistema imune do tambaqui *C. macropomum* estão relacionadas ao uso de probióticos (FERREIRA et al., 2014; DE MELO

LIMA et al., 2018), imunostimulantes (DE OLIVEIRA et al., 2018; RIBEIRO et al., 2018), a influência de fatores ambientais (SALAZAR-LUGO et al., 2009; SYLVAIN et al., 2016) e caracterização de alguns componentes humorais séricos como imunoglobulinas e lectinas séricas (CARVALHO et al., 2012; DIAS et al., 2015). No entanto, pouco se conhece sobre a variação da resposta imune ao longo da vida do animal, sendo este um fator importante na previsão da susceptibilidade a doenças em diferentes fases do ciclo produtivo.

Quanto à resposta imune frente a infecções por acantocéfalos, os estudos avaliam principalmente os danos teciduais e a resposta imune celular associada ao local da infecção (DE MATOS et al., 2017; JERÔNIMO et al., 2017; AGUIAR et al., 2018). Contudo, há uma lacuna quanto à caracterização da resposta humoral, produção de anticorpos locais (nas mucosas) e sistêmicos (plasma) ou quanto à modulação de componentes imunes inatos e adaptativos mediante a infecção por parasitas intestinais como *Neoechinorhynchus buttnerae*, sendo tais estudos inexistentes na literatura até o momento. O presente estudo teve como objetivo geral avaliar a resposta imune humoral sistêmica e local do tambaqui *Colossoma macropomum*, propondo-se uma metodologia adaptada para a purificação e quantificação de imunoglobulinas na mucosa intestinal. Além disso, teve-se por objetivo comparar a expressão de anticorpos e enzimas relacionadas à imunidade dos peixes tanto no soro quanto no muco intestinal de tambaqui, utilizando animais em diferentes fases de desenvolvimento, não infectados e infectados por *Neoechinorhynchus buttnerae*.

Esta **Dissertação** é composta por uma Introdução Geral e por três capítulos:

O **Capítulo I** é o artigo de revisão que aborda os componentes imunes que participam da resposta imune inata e adaptativa dos peixes teleósteos já descritos quando esta infecção é causada por helmintos ectoparasitos e endoparasitas.

O **Capítulo II** teve como objetivo principal apresentar um método para purificação e a titulação das imunoglobulinas presentes no muco intestinal de tambaqui, *Colossoma macropomum*, não-infectados e infectados pelo acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae*.

O **Capítulo III** compara a resposta imune humoral inata e adaptativa de tambaqui no soro e no muco intestinal, avaliando o efeito das diferentes fases de desenvolvimento sobre determinados componentes humorais do sistema imune desta espécie e a modulação desses componentes pela infecção causada por *N. buttnerae*.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L. S. et al. Distribution of the acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae* and semiquantitative analysis of histopathological damage in the intestine of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Parasitology Research**, v. 117, n. 6, p. 1689–1698, 2018.
- CHAGAS, E. C. et al. Infecções por acantocéfalos: um problema para a produção de peixes. In: DIAS, M.T.; MARIANO, W.S. *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas*. São Carlos: Pedro & João Editores. v. 1, p. 305–328, 2015.
- DE MATOS, L. V. et al. Morphological and histochemical changes associated with massive infection by *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) in the farmed freshwater fish *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 from the Amazon State, Brazil. **Parasitology research**, v. 116, n. 3, p. 1029–1037, 2017.
- DE MELO LIMA, V. M. et al. Probiotics in Aquaculture Review: Current Status and Application in Tambaqui Cultivation (*Colossoma macropomum*). **International Journal of Advanced Engineering Research and Science**, v. 5, n. 5, 2018.
- DE OLIVEIRA, S. R. N. et al. Toxicity of *Lippia origanoides* essential oil in tambaqui (*Colossoma macropomum*) and its effect against *Aeromonas hydrophila*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 44, n. 2, p. 1–7, 2018.
- DE SANT'ANA, F. J. F. et al. Outbreaks of *Piscinoodinium pillulare* and *Henneguya* spp. infection in intensively raised *Piaractus mesopotamicus* in Southwestern Goiás, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 121-125, 2012.
- DIAS, C. A. C. DE V. et al. Caracterização parcial das imunoglobulinas de *Plesiotrygon iwamae* (Chondrichthyes-Potamotrygonidae) e de *Colossoma macropomum* (Osteichthyes-Characidae) isoladas com ácido caprílico. **Scientia Amazonica**, v. 4, n. 2, p. 1–9, 2015.
- DIAS, M. K. R. et al. Parasitic infections in tambaqui from eight fish farms in Northern Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 4, p. 1070-1076, 2015.
- FERREIRA, C. M. et al. Características histomorfométricas do intestino de juvenis de tambaqui após uso de probiótico na dieta e durante transporte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 12, p. 1258–1264, 2014.
- FLORES, R. M. V.; FILHO, X. P.; MUNOZ, A. E. P. Transformations in brazilian aquaculture: Technological intensification and capital concentration. Challenging new

frontiers in the global seafood sector: Proceedings of the Eighteenth Biennial Conference of the International Institute of Fisheries Economics and Trade, July 11-15, 2016. Compiled by Stefani J. Evers and Ann L. Shriver.

IBGE, Produção da Pecuária Municipal, Rio de Janeiro, 2017.
<https://www.ibge.gov.br/%0Aestatisticas-novoportal/%0Aeconomicas/agricultura-epecuaria/9107-producao-dapecuaria-municipal.html>. Acessado em 26 de Junho de 2019.

JERÔNIMO, G. T. et al. *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala) infection in farmed *Colossoma macropomum*: A pathological approach. **Aquaculture**, v. 469, p. 124–127, 2017.

LACERDA, A.C.F. et al. Comparative parasitism of the fish *Plagioscion squamosissimus* in native and invaded river basins. **Journal of Parasitology**, v. 98, n. 4, p. 713-717, 2012.

LOURENÇO, F. DE S. et al. Ocorrência de *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *buttnerae* GOLVAN, 1956 (ACANTOCEPHALA: NEOCHINORHYNCHIDAE) em *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) (CHARACIFORMES: SERRASALMIDAE) provenientes de uma piscicultura da Amazônia brasileira. **Folia Amazônica**, v. 26, n. 1, p. 1–8, 2017.

MACIEL CARVALHO, E. V. M. et al. Detection of the first lectin with antimicrobial activity present in serum of the Amazonian fish tambaqui *Colossoma macropomum*. **Fisheries Science**, v. 78, n. 4, p. 879–887, 2012.

MALTA, J. C. O.; GOMES, A. L. S.; ANDRADE, S. M. S.; VARELLA, A. M. B. Infestações maciças por acantocéfalos, *Neoechinorhynchus buttnerae* Golvan, 1956, (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) em tambaquis jovens, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) cultivados na Amazônia central. **Acta Amazonica**, v. 31, n.1, p. 133-143, 2001.

OLIVEIRA, S. R. K. S.; BEZERRA, M. V. P.; BELO, M. A. A. Estudo da endofauna parasitária do tambaqui *Colossoma macropomum*, em pisciculturas do Vale do Jamari, Estado de Rondônia. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, p. 1026-1041, 2015.

PEREIRA, J. N.; MOREY, G. A. M. First record of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Eoacanthocephala, Neochinorhynchidae) on *Colossoma macropomum* (Characidae) in a fish farm in Roraima, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 48, n. 1, p. 42–45, 2018.

RIBEIRO, S. C. et al. Antioxidants effects and resistance against pathogens of *Colossoma macropomum* (Serrasalmidae) fed *Mentha piperita* essential oil. **Aquaculture**, v. 490, p. 29–34, 2018.

SALAZAR-LUGO, R. et al. Paraquat and temperature affect nonspecific immune response of *Colossoma macropomum*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 27, n. 3, p. 321–326, 2009.

SYLVAIN, F.É. et al. pH drop impacts differentially skin and gut microbiota of the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 32032, 2016.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 4, p. 913-918, 2017.

VIDEIRA, M. et al. An outbreak of myxozoan parasites in farmed freshwater fish *Colossoma macromum* (Cuvier, 1818) (Characidae, Serrasalminae) in the Amazon region, Brazil. **Aquaculture Reports**, v. 3, p. 31-34, 2016.

Capítulo I

Immune response of teleost fish to helminth parasite infection

Artigo aceito pela revista: Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. ISSN (eletrônico): 1984-2961. Frequência: Trimestral.

Immune response of teleost fish to helminth parasite infection

Resposta imune de peixes teleósteos às infecções por helmintos parasitos

Damy Caroline de Melo Souza ¹

Maria Cristina dos Santos ²

Edsandra Campos Chagas ³

¹ Programa de Pós-Graduação de Ciências Pesqueiras nos Trópicos, Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

² Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

³ Embrapa Amazônia Ocidental, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Abstract

Fish immune systems have become the subject of several studies due to the growing development of aquaculture and fisheries, and the demand for healthy produce for human consumption. Among the parasites responsible for diseases in fish farming, helminths stand out because they cause infections in farmed fish and decrease food conversion, zootechnical performance and meat quality. In the present review, the components that participate in the innate and adaptive immune responses of teleost fish that have so far been described are presented in order to summarize the defenses that these hosts have recourse to, in combating different groups of parasites.

Keywords: parasites, immune system, aquaculture

Resumo

O sistema imune dos peixes tem se tornado alvo de muitas pesquisas devido ao crescente desenvolvimento da aquicultura e da pesca, assim como a exigência de obtenção de animais saudáveis para o consumo humano. Dentre os parasitos responsáveis pelas enfermidades na piscicultura, os helmintos destacam-se por causarem infecções nos peixes cultivados e por ocasionarem diminuição da conversão alimentar, do desempenho zootécnico e da qualidade da carne. Nesta revisão, apresentaremos os componentes que participam das respostas imunes inata e adaptativa dos peixes teleósteos já descritos, a fim de sintetizar à quais defesas o hospedeiro recorre frente aos diferentes grupos de parasitos.

Palavras-chave: parasitos, sistema imune, aquicultura

Introduction

Studies on fish immune systems have increasingly gained attention due to the growing development of aquaculture, given that occurrence of infections in fish is harmful to the entire production chain (LEUNG & BATES, 2013; TAVARES-DIAS & MARTINS, 2017). Considering the conditions to which fish are subjected in farming systems, such as confinement, high density, excessive handling and transportation, their susceptibility to infectious agents due to the stress produced is greater (OBA et al., 2009; MAGNADOTTIR, 2010). Besides that, the suppressive effect in immune system of fishes is observed not only after handling in farming systems but also as a consequence of deficiencies in environmental quality (oxygen, pH, temperature and ammonia levels, among others) and in diet (DECOSTERE et al., 1999; SALVADOR et al., 2003; TORT, 2011).

The diversity of helminths that infect farmed fishes is lower when compared to wild fishes (HEUCH et al., 2011; LI et al., 2018) due to restriction in contact between host and parasites, however, the infection levels in farmed fishes is higher, condition that is usually attributed to higher fishes densities (VIOLANTE-GONZÁLEZ et al., 2009; COSTA et al., 2019). In turn, wild fish are more susceptible to co-infections due to the diversity of parasites that are found in environment. In this condition, the host immune system response can be modulated by one pathogen influencing its response to the subsequent infections, resulting in immune suppression or in a faster response to infection (SCHMIDT-POSTHAUS et al., 2013; KOTOB et al., 2017).

For example, Roon et al. (2015) demonstrated that an infection by trematode *Nanophyetus salminola* impaired the immune response and increased the mortality of *Oncorhynchus tshawytscha* when exposed to *Flavobacterium columnare*. Thus, the primary infection has a direct impact in survival of fish in natural environment. Despite this, co-infection of parasites in fish are very common in nature, either the relationship between the parasites are synergetic or antagonistic, shaping the community dynamics (BARTOLI & BOUDOURESQUE, 2007; HOSHINO et al., 2016).

Immune system of teleost fish

The immune system acts in defense against infections caused by non-self agents in all living beings, in immune surveillance (to avoid appearance of tumors) and in maintenance of vital functions (homeostasis), even in hostile environments (OLABUENAGA, 2000). Didactically, the immune system is divided into the innate immune system (IIS) and the

adaptive immune system (AIS). The components of the IIS trigger an immediate broad-spectrum response because they recognize vital compounds that can be found in the major groups of pathogens (URIBE et al., 2011). This response directs and activates the AIS, which in turn assembles a specific response for each antigen (immunogen) or pathogen. The IIS response usually has the same duration in each contact with antigens, while the AIS presents a faster response in subsequent contacts with induction agents because it produces memory cells. Therefore, cell and molecular components of IIS and AIS act together and simultaneously in relation to defense mechanisms and maintenance of homeostasis (SECOMBES & WANG, 2012).

Fish innate immune system

The components of the innate immune system, such as pattern recognition receptors (PRR), are found in all vertebrates and in some invertebrates, and have also already been described in several plant species (JONES & DANGL, 2006; GHOSH et al., 2011). Teleost fish have an IIS composed of physical barriers formed by scales, epidermis and mucus; chemical barriers such as serum epithelial lysozymes, molecules of the complement system, antibacterial peptides and lectins in the coating mucus; and microbiological barriers formed by commensal bacteria in the skin, gills, and intestines of these fish (WATTS et al., 2001; GÓMEZ & BALCÁZAR, 2008).

A variety of humoral components, such as transferrin, interferon, inhibitory proteins, lysozymes acting alone or in cascades, antiproteases, type C lectins, pentraxins, natural antibodies, cytokines and chemokines can be found in the plasma, mucus and other body fluids (MAGNADÓTTIR, 2006). In addition to these components, fish present leukocytes analogous to those found in mammals, such as T lymphocytes, B lymphocytes, cytotoxic cells (similar to NK cells), macrophages, eosinophils and polymorphonuclear leukocytes (LIESCHKE & TREDE, 2009). Macrophages and other leukocytes are particularly important in inflammatory processes and have the advantage of being able to rapidly mobilize a large number of cells because they have receptors that recognize a wide range of pathogens (SECOMBES, 1996; URIBE et al., 2011).

Fish adaptive immune system

The AIS only appeared, in terms of evolution, approximately 525 million years ago. It formed a defense system that became increasingly important and sophisticated as jawed vertebrate predators came into existence (FLAJNIK & KASAHARA, 2010). The RAG1 and RAG2 genes are responsible for the rearrangement of immunoglobulin D (diversity) J

(junction) gene (D) gene segments, producing a diversity of antigen receptors expressed on T and B lymphocyte membranes. The antigenic peptides presented by major histocompatibility complex (MHC) of class I and class II molecules interact directly with cytotoxic and auxiliary T lymphocytes receptors, respectively (COOPER & ALDER, 2006). Thus, the adaptive immune response consists of a complex network that involves specialized cells, proteins, genes and cell signaling mechanisms, in order to allow organisms to specifically respond to antigens.

Immunoglobulins (antibodies) in teleost fish can be produced by B lymphocytes, both from the IIS (B1) and from the AIS (B2). The predominant class of immunoglobulin in teleost fish is M (IgM) (ACTON et al., 1971). However, two other classes of immunoglobulins can also be identified: IgT/IgZ (DANILOVA et al., 2005) and IgD (EDHOLM et al., 2010). Class IgT has been associated with the immunity of the intestinal mucosa (ZHANG et al., 2010). In rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Zhang et al. (2011) detected higher levels of IgT in the intestinal mucosa and higher levels of IgM in plasma, in response to intestinal infection caused by bacteria. This suggests that the immunoglobulin IgT presents specialized action in the intestinal mucosa. However, the function of this immunoglobulin and the processes that trigger its production remain unknown, but is likely to have similar functions to mammalian IgD (MASHOOF & CRISCITIELLO, 2016). In teleost fish, antibodies can be found in their skin, intestines, gills, bile and, systemically, in plasma. The immune response of the skin, gills and intestines is particularly important, since these present direct contact with the environment (URIBE et al., 2011).

Immune organs

Production of immune system cells, i.e. myelopoiesis, occurs in the cephalic kidney and in the spleen, given that fish do not present bone marrow. The cephalic kidney is responsible for hematopoiesis and produces cells that enable phagocytosis and production and secretion of a large proportion of the immunoglobulins, and that also enable immunological memory (ZAPATA et al., 2006; WHYTE, 2007). The spleen is a secondary lymphoid organ in which antigens are captured from the bloodstream, antibodies are processed and B lymphocytes are activated and differentiated. It thus plays an important role in starting the adaptive immune response (WHYTE et al., 1990; BROMAGE et al., 2004; SALINAS et al., 2011).

The thymus is a primary lymphoid organ located close to the opercular cavity of fish that has the function of producing T lymphocytes (BOWDEN et al., 2005). Differently from

mammals, the development of the thymus in fish depends more on hormonal factors and seasonal changes than on age (RAUTA et al., 2012).

The mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) in teleost fish protects the intestines, skin and gills. Although MALT does not present any form of organization resembling Peyer's patches in mammals, it presents macrophages, lymphocytes, plasma cells, mast cells and other granulocytes that are seen in the lamina propria of epithelial tissues (PRESS & EVENSEN, 1999). The antibodies found in MALT present spatial and quantitative differences in relation to the antibodies found in plasma, thus showing that MALT is locally able to promote antigen capture and antibody production (SALINAS et al., 2011; XU et al., 2013; ROMBOUT et al., 2014).

Fish Diseases and Triggering of the Immune Response

The immune response in teleost fish can be modulated by environmental and hormonal factors, nutritional state and the phase of life of the fish (BOWDEN, 2008; RAUTA et al., 2012; MARTIN & KRÓL, 2017; SZWEJSER et al., 2017). In their natural environment, fish are parasitized by various groups, such as protozoa, myxosporeans, crustaceans and helminths (THATCHER, 2000; MALTA et al., 2001; FISCHER et al., 2003; LUQUE, 2004; WIEGERTJES et al., 2005; CAMPOS et al., 2008; ARAÚJO et al., 2009). Although the diversity of parasite helminths in farmed fish is lower than in wild fish, parasitism is more easily disseminated in fish farms because the high densities of fish contribute towards spreading of pathogens (MAGNADOTTIR, 2010).

Among the various pathogenic agents responsible for causing diseases in fish, helminths are a group of parasites that present epidemiological importance because the injuries that they cause favor occurrences of secondary infections, thus hampering the diagnosis and treatment (PYLKKÖ et al., 2006; MDEGELA et al., 2011; KOTOB et al., 2017). In addition, helminth infection can also lead to hematological and metabolic alterations that may be harmful to the health of fish, compromising fish survival, feed conversion, and consequently their grow rate (HIRAZAWA et al., 2016; ROCHA et al., 2018). Therefore, the present review provide an overview of the efforts that has been made to understand fish reactions to helminth infection, highlighting the main immune responses of teleost fish to infections caused by these parasites

Infection by helminths in teleost fish

“Helminth” is a generic term that is used to refer to worms that belong to the phyla Platyhelminthes, Nematoda and Acanthocephala. These worms cause infections both in vertebrates and in invertebrates and most of these parasites have co-evolved with their hosts (SITJÀ-BOBADILLA, 2008). Regarding the phylum Platyhelminthes, the species that belong to the classes Trematoda, Cestoda and Monogenea (EHLERS, 1986) are all parasites, and are responsible for occurrences of diseases in several economically important fish species (OGAWA, 2015). However, both parasitic and free-living species can be found in the phyla Nematoda and Acanthocephala.

Monogenea are mostly ectoparasites, and are mainly found in the gills, nostrils, eyes and body surface of fish. In turn, helminths such as trematodes, cestodes, acanthocephalans and nematodes are endoparasites that may infect the eyes, muscles and gastrointestinal tract (GROBBELAAR et al., 2015; OGAWA, 2015; DEZFULI et al., 2016). As reviewed by Sitjà-Bobadilla (2008), helminths have evolved using strategies of evading the immune system of fish, such that, among other strategies, they are able to mask their antigens by bonding to the host's molecules, incorporate these molecules in their surface layer and explore the host's immune response itself in order to increase their adhesion to the infection area. On the other hand, fish immune system respond with the aim of eliminating parasites or coexisting with them when attempts to eliminate them fail.

One of the main and most frequent reactions of fish intestines against parasites consists of hyperplasia of mucus-producing cells, which leads to excessive secretion of mucus around parasites (DEZFULI et al., 2016). The tissue damage caused by helminth infections induces rapid production of cytokines and chemokines by innate immunity cells, such as ILC2s (type 2 innate lymphoid cells), with mobilization of neutrophils, basophils and eosinophils (HARRIS, 2017).

The cell response to infection can vary, depending on the type of injury caused by parasites and their depth of penetration. Rodlet cells are granular leukocytes that are only found in teleost fish. They are mainly recruited in cases of infections caused by helminths or by the presence of harmful agents in tissues (REITE & EVENSEN, 2006). These cells participate in the inflammatory response when helminths are only adhering to the intestinal epithelium, while the presence of granulocytes and macrophages increases as penetration into the intestinal wall becomes deeper (DEZFULI et al., 2011). In fish parasitized by helminths, large numbers of mast cells have been found in infected regions, thus indicating that this cell

type has a relationship with the response to these parasites (REITE & EVENSEN, 2006; DEZFULI et al., 2013).

When parasites infect the host's tissues, the damaged/dead cells release alarmins, also known as damage-associated molecular patterns (DAMPs), which promote inflammatory responses. Alarmins stimulate macrophages, dendritic cells and local mast cells to release pro-inflammatory cytokines and chemokines, which will result in leukocyte migration into the infected region (BIANCHI, 2007). Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) stimulates local release of cytokines and chemokines, thereby attracting neutrophils into tissue injury sites and promoting antigen presentation, phagocytosis and co-stimulation of T lymphocytes. Interleukin-1 β is a type of cytokine that stimulates production of mucus, degranulation of eosinophils/basophils and increased adhesion of neutrophils to vascular endothelium (SECOMBES et al., 2001). Interleukin-6 seems to play an important role in regulation of the transition between the inflammatory phase, with predominance of neutrophils, and the phase in which macrophages predominate (COSTA et al., 2011) (Figure 1A).

Production of immunoglobulins can occur locally in the mucosa as a consequence of antigen capture by intraepithelial lymphocytes (antigen-presenting B lymphocytes), macrophages and dendritic cells (LUGO-VILLARINO et al., 2010; ROMBOUT et al., 2011). These cells present antigens to auxiliary T lymphocytes that, in turn, co-stimulate B lymphocytes (via interleukin-4) so as to activate them and stimulate their differentiation (ZHU et al., 2012). In addition, auxiliary T lymphocytes promote the final differentiation of B lymphocytes into plasma cells. Plasma cells secrete immunoglobulins (predominantly IgM and IgT/IgZ in the mucosa) that may permeate body fluids or be transported into the mucus by polymeric immunoglobulin receptors (pIgR) (ROMBOUT et al., 2014) (Figure 1B).

It is believed that the spleen is the main lymphoid organ associated with the production of systemic antibodies in fish (YE et al., 2013). In this organ, the antigens presented by dendritic cells activate naïve T lymphocytes and differentiate them into auxiliary T lymphocytes (via interleukin-4), which will activate and stimulate differentiation of B

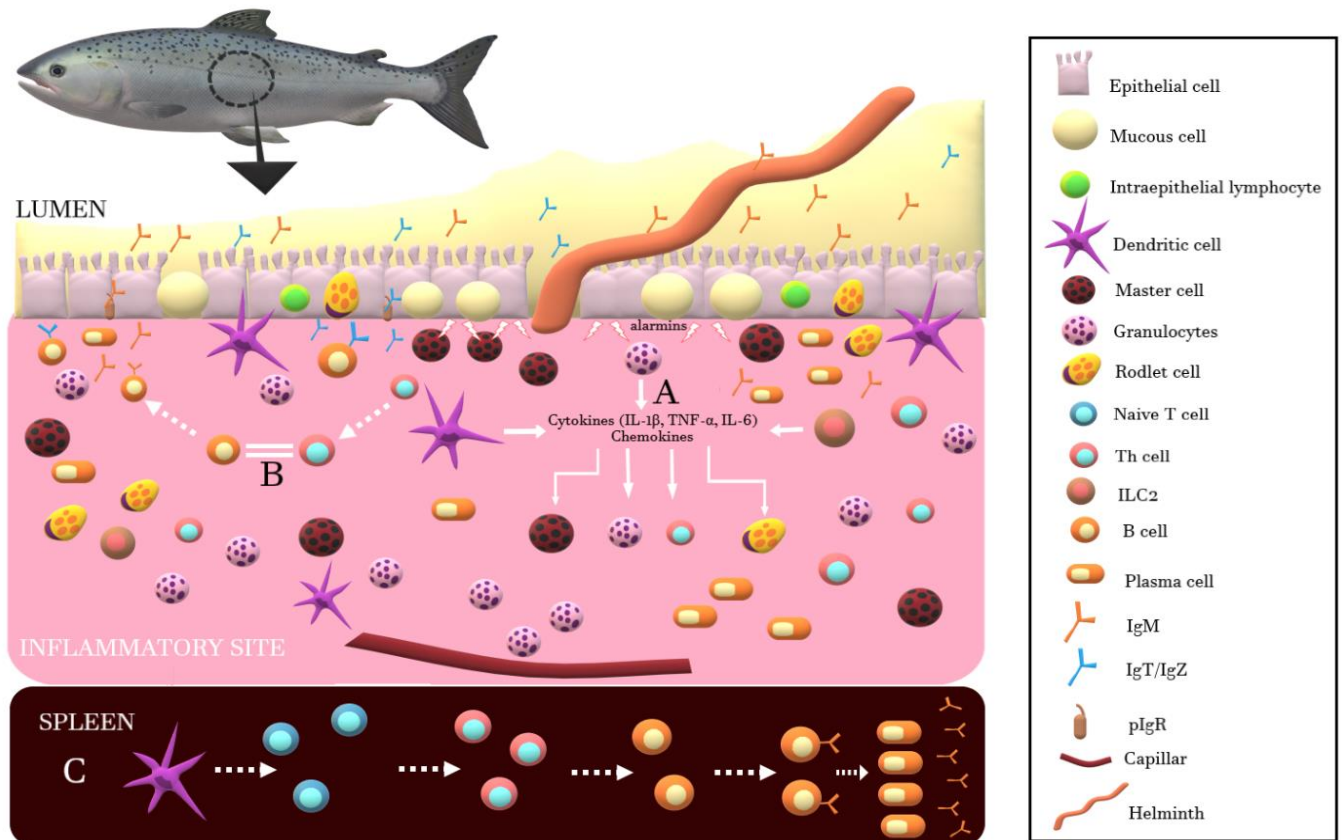


Figure 1. Fish immune response to parasite helminths.

lymphocytes that are present in the marginal region of the spleen (lymphocytes B2). This results in production of systemic antibodies (Figure 1C). However, the increased production of antibodies that is detected as a response to various parasites may or may not result in acquired protection for the host (WOOD & MATTHEWS, 1987; AIKEN et al., 2008; SANDOVAL-GÍO et al., 2008).

Monogenea

Monogeneans are mainly found parasitizing the gills and tegument of fish. Presence of these pathogens can cause chronic debility, reduced growth and, in some cases, fish mortality as a consequence of damage to the epithelial tissue, which act as a gateway for secondary infections caused by viruses, fungi and bacteria (THONEY & HARGIS JR, 1991). In an analysis on the hematological and biochemical parameters of catfish (*Pangasaianodon*

hypophthalmus) infected by *Thaparocleidus* sp., significant increases in leukocyte counts and plasma glucose levels were observed in groups with high and moderate levels of infection (KUMAR et al., 2018). Hirazawa et al. (2016) observed that groups of greater amberjack (*Seriola dumerili*) that were infected by the monogenean *Neobenedeni girellae* presented lower growth and reduced appetite and significant reductions in total proteins and globulins, compared with groups that were uninfected. Leukocytes alterations such as neutrophilia and lymphocytosis are usually observed in infection by monogeneans, and it is also related increases in hemoglobin concentration and the number of erythrocytes as a consequence of reduced respiratory surface in gills (TAVARES-DIAS et al., 2008; ARAÚJO et al., 2009; MARINHO et al., 2015).

In a study on meagre (*Argyrosomus regius*) infected by *Diplectanum sciaenae*, Andree et al. (2015) reported occurrences of hyperplasia and severe injury to the lamellar epithelium, with moderate inflammation and presence of macrophages and lymphocytes in parasite anchorage regions. Faliex et al. (2008) studied the expression of genes associated with the immune response in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) infected by *Diplectanum aequans*. They detected increased expression of interleukin-1 β (IL-1 β) in the spleen and gills, which indicated the presence of a local inflammatory response. Dezfuli et al. (2010a) observed that hyperplasia and proliferation of mucous cells and rodlet cells occurred during the inflammatory response. In addition, a subpopulation of mast cells was found in the infected region, with presentation of piscidin-3 (an antimicrobial peptide) in cytoplasmic granules. This suggests that these cells participate in the response to these parasites.

In addition to inflammatory responses, fish may also produce specific antibodies in occurrences of infections by monogeneans. For example, in rainbow trout (*O. mykiss*) the production of immunoglobulins specific to *Discocotyle sagittata* have been detected in fish sera. However, titration of these antibodies did not present any correlation with the intensity of infection (RUBIO-GODOY et al., 2003). On the other hand, Costa et al. (2019) observed that increases in total counts of leukocytes was significantly correlated with the intensity of infection caused by monogeneans in the gills of tambaqui (*Colossoma macropomum*). In addition, the parasitism as well as the level of immunoglobulins in tambaqui was higher in highest stocking densities, indicating that higher densities favors parasitism in these systems.

In turn, in olive flounders (*Paralichthys olivaceus*), a glycoprotein of the ciliated surface of the monogenean *N. girellae* was found to induce production of specific antibodies that were detected in the mucus and plasma of infected individuals. These antibodies presented agglutinating and immobilizing action against larvae of monogeneans, thus

indicating that there was an integrated response between the IIS and AIS. Despite this, the study did not show any occurrence of acquired protection in cases of reinfection (HATANAKA et al., 2005). Further studies relating to the immune response to infections caused by monogeneans are listed in Table 1.

Cestoda

In fish infected by cestodes, the IIS induces an inflammatory reaction to adhesion structures of parasites in the intestinal mucosa (BUCHMANN & LINDENSTRØM, 2002). Morley and Hoole (1995) evaluated the structural modifications to the parasite-host interface of *C. carpio* that were infected by *Khawia sinensis*. They observed that the damage in regions where parasites adhered was minimal. This damage consisted of flattening of adjacent epithelial cells and increased mucus production around the parasites. There was also mobilization of cells such as macrophages, eosinophils and lymphocytes, which were even found as aggregates on the tegument of the parasites. In turn, in infection caused by *Eubothrium crassum* in *O. mykiss*, there was mild enteritis, epithelial flaking and vacuolization of epithelial cells, along with infiltration of mast cells and rodlet cells and granulation of the lamina propria and submucosa (BOSI et al., 2005). Abdelmonem et al. (2010) described an inflammation in the intestinal mucosa caused by *Proteocephalus macrocephalus* in eels (*Anguilla anguilla*), which indicated that hyperplasia of goblet cells was occurring and that, consequently, a large amount of mucus was covering parasites. Infiltration of leukocytes into the lamina propria was also observed.

Molnár et al. (2003) investigated infection of *Atractolytocestus huronensis* in *C. carpio* and found the epithelium had degenerated and been transformed into balloon-shaped epithelium. In some cases, there was also absence of contact between the epithelium and the parasites' bodies. In this same study, lymphocytes and monocytes were observed adhering to the parasites' bodies, at the adhesion sites. In infected Prussian carps (*Carassius gibelio*), metacestodes of *Neogryporhynchus cheilancristrotus* were found in the lamina propria of bowel folds, surrounded by lysed and fragmented connective tissue cells, with major infiltration by macrophages (MOLNÁR, 2005). In *Silurus glanis*, close to the adhesion sites for the parasite *Glanitaenia osculata*, it was reported that neutrophils and several mast cells were close to and/or in contact with endocrine cells and mucous cells, thus indicating that an interaction between these cells was present during the regulation process of the inflammatory response (DEZFULI et al., 2017).

Nie and Hoole (1998) evaluated the antibody response in *C. carpio* that were naturally infected by *Bothriocephalus acheilognathi*, and after intraperitoneal administration of an extract made from parasite bodies. Production of specific antibodies was observed three weeks after injection of the extract, and increased numbers of antibodies and plasma cells in the plasma were observed in the naturally infected fish. However, these numbers were not significantly higher than in the uninfected group. In relation to this group of parasites, it has also been observed in some studies that parasites modulate the host's immune response (as an evasion strategy), thereby inhibiting production of antibodies and the activity of T lymphocytes (MAZUR & TOLOCHKO, 2015). Other studies relating to the immune response to infections by cestodes are listed in Table 1.

Trematoda

Infections caused by adult trematodes only rarely cause severe diseases or lead fish to death. However, in most cases, they induce local inflammatory responses. On the other hand, entry and migration of metacercariae in tissues may cause local hemorrhage and tissue damage (WOO et al., 2011). In addition, infection by trematodes may increase the susceptibility of fish to infection by bacteria, thus inducing a more exacerbated inflammatory response (PYLKKÖ et al., 2006). Infections caused by trematodes in *A. anguilla* mainly damage the villi of the mucosal epithelium. According to Dezfuli et al. (2015), the parasites found in intestines were covered by a thick layer of adherent mucus. In this region, a large number of rodlet cells and mucosal cells was found. In turn, in *Tinca tinca*, infection by trematodes in the gills, intestine, spleen, kidney and heart produced granulomas around metacercariae that were encysted in the submucosa, muscle and serous layer. Mobilization of mast cells, rodlet cells and neutrophils was also seen; and formation of melanomacrophage centers, i.e. macrophages containing melanin pigments, was present (DEZFULI et al., 2013).

In a study on Pacific bluefin tunas (*Thunnus orientalis*) that presented infection by *Didymocystis wedli* in their gills, increased levels of interleukin-1 β and TNF- α were observed. In this organ, parasites were also found encysted in the fibrous layer of the connective tissue, but with only a small number of lymphocytes (MLADINEO & BLOCK, 2010). Constenla et al. (2011) observed that in situations of infection by *Bathycreadium elongatum* in *Trachyrincus scabrus*, several nodules were formed in the pyloric cecum, in which degraded digeneans were found. These nodules presented granulomas with several layers of connective tissue, and macrophages were the most abundant cells.

Cell responses to infections by *Sanguinicola inermis* in *C. carpio* was also found to induce production of specific antibodies and activation of complement system proteins in plasma (ROBERTS et al., 2005). These responses were positively correlated with higher room temperature, thus showing that this factor also influences the immune response in these fish. In another study conducted on *O. mykiss*, macrophages presented a larvicidal activity against the infecting phases of *Diplostomum spathaceum*. It was also observed that the action of macrophages was greater when specific antibodies were present, with reduction in the number of species of Diplostomidae in the eyes of immunized trout (WHYTE et al., 1990). Other studies that have report the immune responses to infections by trematodes are listed in Table 1.

Trematodiasis in humans due to infection of fish-borne trematodes are largely described in literature (CHAI et al., 2005; SRIPA et al., 2010). Particularly, the liver flukes (family: Opisthorchiidae) are of public health importance, since they cause several diseases as pancreatitis, cholangiocarcinoma and cholangitis, and are acquired from a wide range of intermediate host, which hampers these parasite control (HUNG et al., 2013). The main cause of human infection is the consumption of raw or undercooked fish, which has become a widespread fashion in the world, making it easier to parasite dissemination.

Nematoda

In a study conducted by Dezfuli et al. (2016), the damage caused by the nematode *Contracaecum rudolphii* in the intestines of *A. anguilla* was found to result in formation of granulomas, with a high number of mast cells in the outer regions, and fibroblasts in the innermost regions. In specimens of pirarucu (*Arapaima gigas*), infection by *Spirocamallanus inopinatus* resulted in focal necrosis areas, flaking of epithelium, hemorrhage, inflammatory infiltrate and formation of fibrous capsules around parasites (GAINES et al., 2012). Besides that, in infection by nematodes is usually observed alterations in hematological parameters such as increase in total leukocytes count and mean corpuscular volume of erythrocytes (KUNDU et al., 2016; MARTINS et al., 2017).

In South American silver croakers (*Plagioscion squamosissimus*) infected by nematodes of the family Anisakidae, the parasites were found in cysts composed of multilayered connective tissue and a membranous capsule with collagenous fibers, which were surrounded by aggregates of macrophages and amorphous substance (MELO et al., 2014). Larvae of the nematode *Anisakis simplex* infecting European flounders (*Platichthys*

flesus) were found encapsulated in the serous layer in the outer surface of the intestine, with presence of rodlet cells and aggregates of macrophages in cysts in infected livers and spleens (DEZFULI et al., 2007). Therefore, this seems to be the strategy used by the immune system to avoid parasite migration and development in hosts' tissues, thus preventing possible tissue damage caused by this migration.

In addition, this may also be a strategy for evading immune system reactions, since some products excreted or secreted by nematodes may decrease the activation of several important genes relating to the immune system (BAHLOOL et al., 2013). Other studies have already detected specific antibodies for nematode parasites in some species, although this characteristic does not present any direct relationship with the ability of hosts to eliminate parasites. However, it may indicate higher resistance to future infections (COSCIA & ORESTE, 1998; 2000). Other studies relating to the immune response to infections by nematodes are listed in Table 1.

Nematodes are parasites of particular interest on studies evaluating potential zoonotic diseases, since its larvae has a tendency of encysting in fish muscle, which is usually the paratenic or intermediate host in the life cycle of nematodes (BUCHMANN & MEHRDANA, 2016). The most fish-borne nematodes found in humans are members of Anisakidae and Gnathostomatidae families, and *Capillaria philippinensis* of Trichinellidae family (EIRAS et al., 2018). The nematodes of these families are reported as parasites of many species of marine and freshwater fishes, but infection in humans can occur by consuming fishes alive, raw or undercooked (CAVALCANTI et al., 2012; ANDRADE-PORTO et al., 2015; RODRIGUES et al., 2015).

Acanthocephala

In infections caused by acanthocephalans such as *Pomphorhynchus laevis*, penetration through all layers of the mucosa, from the epithelial to the serous mucosa, may occur. In this type of infection, the immune system of the host reacts by increasing the mobilization of cells such as neutrophils, plasma cells, lymphocytes and fibroblasts, thus forming a composite fibrous layer, along with local mast cells, in the inflamed tissue (WANSTALL et al., 1986). Dezfuli et al. (2015) described an encapsulating process in which hosts presented a series of spirals of fibrous elements. There were a few degenerated epithelial cells and, close to the

Table 1 Immune components of fish associated with responses to parasite helminthes

Parasite	Species	Host	Immune response	Reference	34
Monogenea	<i>Pseudodactylogyrus</i> sp.	<i>Anguilla anguilla</i>	Acquired resistance (Unknown mechanism)	SLOTVED & BUCHMANN (1993)	
	<i>Neobenedenia girellae</i>	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Acquired resistance (Unknown mechanism)	OGAWA et al. (1995)	
	<i>Neobenedenia girellae</i>	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Antibody production	WANG et al. (1997)	
	<i>Gyrodactylus derjavini</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Alternative complement pathway activation	BUCHMANN (1998)	
	<i>Gyrodactylus salaris</i>	<i>Salmo salar</i>	Alternative complement pathway activation: factors in host serum and mucus	HARRIS et al. (1998)	
	<i>Pseudodactylogyrus anguillae</i>	<i>Anguilla anguilla</i>	Antibody production	MAZZANTI et al. (1999)	
	<i>Neoheterobothrium hirame</i>	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Increased expression of genes related to proteases, immunoglobulin light chain, immunoglobulin heavy chain and B cell differentiation	MATSUYAMA et al. (2007)	
	<i>Neobenedenia melleni</i>	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Specific antibody production detected in host serum and mucus	KISHIMORI et al. (2015)	
	<i>Neobenedenia melleni</i>	<i>Seriola lalandi</i>	Increased level of total protein concentration in serum and anti-protease and myeloperoxidase activity	REYES-BECERRIL et al. (2017)	
	<i>Gyrodactylus kobayashii</i>	<i>Carassius auratus</i>	Increased expression of inflammatory genes: IL-1 β 2, TNF- α 1 and TNF- α 2	ZHOU et al. (2018)	
Cestoda	<i>Thaparocleidus</i> sp.	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	Increased production of lactate dehydrogenase, lactate, creatinine, serum glutamate-oxaloacetate transaminase and serum glutamate-pyruvate transaminase	KUMAR et al. (2018)	
	<i>Diphyllobothrium</i> spp.	<i>Salmo gairdneri</i>	Antibody production correlated with worm burdens in individual fish	SHARP et al. (1989)	
	<i>Diphyllobothrium dendriticum</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Antibody production after 5 weeks of experimental infection	SHARP et al. (1992)	
	<i>Ligula intestinalis</i>	<i>Rutilus rutilus</i>	Specific antibody production to tegumental antigens	WILLIAMS & HOOLE (1992)	
	<i>Diphyllobothrium dendriticum</i>	<i>Coregonus migratorius</i>	Suppression of antibody production	MAZUR & TOLOCHKO (2015)	

Table 1. Continued...

Parasite	Species	Host	Immune response	Reference
Trematoda	<i>Telogaster opisthorchis</i>	<i>Anguilla australis schmidtii</i> ; <i>Anguilla dieffenbachii</i>	Antibody production detected in plasm and intestinal mucus	McARTHUR (1978)
	<i>Diplostomum spathaceum</i>	<i>Salmo gairdneri</i>	Acquired resistance (Unknown mechanism)	STABLES & CHAPPELL (1986)
	<i>Diplostomum spathaceum</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Acquired resistance (increased level of total immunoglobulins and in the proportion of neutrophils and monocytes)	HÖGLUND et al. (1990)
	<i>Rhipidocotyle fennica</i>	<i>Rutilus rutilus</i>	Acquired resistance (antibody production)	AALTONEN et al. (1997)
	<i>Diplostomum spathaceum</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Acquired resistance (Unknown mechanism)	KARVONEN et al. (2004)
	<i>Cardicola forsteri</i>	<i>Thunnus maccoyii</i>	Acquired resistance (antibody production)	AIKEN et al. (2008)
	<i>Cardicola orientalis</i> ; <i>Cardicola opisthorchis</i>	<i>Thunnus orientalis</i>	Increased transcription of IgM, MHC2, TCR- β and IL-8 in heart; Only IgM increased transcription in gills	POLINSKI et al. (2014)
Nematoda	<i>Anguillicola crassus</i>	<i>Anguilla anguilla</i>	Specific antibody production	BUCHMANN et al. (1991)
	<i>Anisakis simplex</i>	<i>Pollachius virens</i>	Acquired resistance (antibody production)	PRIEBE et al. (1991)
	<i>Anguillicola crassus</i>	<i>Anguilla anguilla</i>	Specific antibody production in response to natural infection and injected whole-worm extract	HÖGLUND & PILSTRÖM (1994)
	<i>Anguillicola crassus</i>	<i>Anguilla anguilla</i>	Specific antibody production in response to cuticle and gonad antigens	NIELSEN & BUCHMANN (1997)
	<i>Anguillicola crassus</i>	<i>Anguilla japonica</i> ; <i>Anguilla anguilla</i>	Specific antibody production; Acquired resistance post-immunization in <i>Anguilla japonica</i>	KNOPF & LUCIUS (2008)

Table 1. Continued...

Parasite	Species	Host	Immune response	Reference
Nematoda	<i>Anisakis simplex</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Suppression of IgM transcription, increased expression of CD4 and complement factor C3	HAARDER ³⁶ et al., 2013
	<i>Dentitruncus truttae</i>	<i>Salmo trutta</i>	Increased number of master cells and fibroblasts expressing proliferation cell nuclear antigen (PCNA)	DEZFULI et al., 2012
Acantocephala	<i>Pomphorhynchus kashmirensis</i>	<i>Schizothorax</i> sp.	Antibody production in response to somatic antigens	NAZIR et al., 2013
	<i>Acanthocephlus lucii</i>	<i>Esox lucius</i>	Master cells immunoreactive to piscidin-3, lysozyme, interleukin-6, TNF - α , met-enkephalin	DEZFULI et al., 2018

parasites, a large number of mast cells among the fibers, along with some granules of mast cells that had migrated into the pores of the parasite's tegument.

Martins et al. (2001) described infection in specimens of “curimbatá” (*Prochilodus lineatus*) caused by the acanthocephalan *Neoechinorhynchus curemai*. This gave rise to complete flaking of the intestinal mucosal epithelium. In addition, severe hyperplasia and hypertrophy of goblet cells and a severe inflammatory reaction, with major infiltration of eosinophils and mononuclear leukocytes, were observed. Belo et al. (2013) also described hematological alterations caused by *N. curemai* in specimens of “curimbatá” (*P. lineatus*). They reported that there were greater numbers of monocytes and smaller numbers of thrombocytes, compared with non-parasitized fish.

In the hybrid species “patinga” (*Piaractus mesopotamicus* x *Piaractus brachipomus*), the intestinal mucosa presented flaking and there were infiltrations of mast cells and increased lymphocyte and neutrophil counts in the region where the parasite *Echinorhynchus jucundus* adhered (VENTURA et al., 2017). In specimens of ripsaw catfish (*Oxydoras niger*), occurrences of metazoan parasites such as the acanthocephalan *Paracavisona impudica* caused increased neutrophil counts and decreased lymphocyte counts in the blood (SANTOS & TAVARES-DIAS, 2010). In addition, in carps (*Cyprinus* sp.) and snow trout (*Schizothorax* sp.), eosinophilia was described and were ascribed to damage possibly caused by acanthocephalans (SHAH et al., 2009).

In regions infected by *Echinorhynchus truttae* and *Cyathocephalus truncatus* in *S. trutta*, the bowel villi were damaged such that there were losses, necrosis and degeneration of intestinal epithelia. At points where proboscides adhered, high numbers of lymphocytes, mast cells, eosinophils and collagenous fibers were observed, and the number of mucous cells was much larger than in regions where adhesion did not occur (MLADINEO et al., 2009; DEZFULI et al., 2010b). In specimens of *S. trutta* parasitized by *Dentitruncus truttae*, most parasites did not go beyond the granular layer, but some specimens were observed to have their proboscides in muscle layers (DEZFULI et al., 2008).

Jerônimo et al. (2017) observed that specimens of tambaqui (*Colossoma macropomum*) that were infected by the acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae* presented thickening and hardening of the intestinal wall. Histologically, an intense inflammatory reaction characterized by the presence of macrophages, dendritic cells and some lymphocytes was described, with formation of granulomas in the submucosal layer of some fish. Histochemical techniques revealed the presence of increased production of acidic mucous substances by hosts as a response to infection (MATOS et al., 2017). Hematological

alterations were also observed in *C. macropomum* infected by *N. buttnerae* and others metazoan species, with a negative correlation between the abundance of acanthocephalans and parameters such as hematocrit, hemoglobin concentration and total thrombocytes (ROCHA et al., 2018).

In an evaluation on the immune response of European chubs (*Squalius cephalus*) that were either naturally or experimentally infected by *P. laevis* (Acanthocephala), Harris (1972) detected production of immunoglobulins both in the plasma and in the intestinal mucosa of infected fish. In quillbacks (*Carpiodes cyprinus*), titration of plasma antibodies was conducted by means of immunoprecipitation. The precipitation reaction was more intense against antigens of mature male and pregnant females of *Neoechinorhynchus carpiodi*. However, the greater the intensity of infection was, the lower the titers of antibodies were. Moreover, use of Evans blue staining (EB) showed that there was higher intensity of staining denoting presence of serum proteins in regions where nodules formed (SZALAI et al., 1988). Regarding the group Acanthocephala, few studies have yet addressed the humoral response of the immune system in teleost fish (Table 1). This is probably because few species have been correlated with teleost fish of high economic value or have been shown to cause severe damages to these fish.

Alternatives for Diagnosis of Helminth Infection in Fish

The efforts in diagnostic of helminth infections are mainly directed to those species that may cause diseases in human, once they have a direct impact in public health. Infections by helminths usually are diagnosticated by necropsy of animals and directly visualization of tissues under light microscope, which requires extensive laboratory work. New methods of detection and identification of helminths have been developed as a faster and less invasive alternative for diagnosis of pathogens in fishes (EL DEEN et al., 2018).

Infections by nematodes are currently diagnosed by visual inspection of larvae and histopathology analysis of fish muscle (GAMBOA et al., 2012). As an alternative, molecular techniques as real-time polymerase chain reaction (PCR) with high-resolution molecular analysis was employed to detect and quantify the presence of *Anisakis simplex* in fish, enabling even taxa differentiation of other parasites (JAISWAL et al., 2017). For fish products, usually it is used UV illumination, artificial digestion by the utilization of chloridric acid and pepsin, and recently it was developed a new method called TrichinEasy® digestion system, a confirmatory test of the presence of the larvae (CAMMILLERI et al., 2016).

Accidental ingestion of trematodes larvae in fish muscle is the main cause of its infection in human. Therefore, detection of liver fluke in fish is important for its prevention, especially in endemic areas. The usual method for diagnosis of liver fluke in fish is the enzymatic digestion of fish tissue and direct microscopy techniques (SRIPA et al., 2007) Cai et al. (2010) developed a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay that allows a sensitive and fast detection of liver fluke *Clonorchis sinensis* metacercariae in fish. The method was 100 times more sensible than conventional PCR and could be applied as well to identification of other species of trematodes in fish.

For aquaculture, there is still a huge gap in diagnosis methods that could be applied to detection and accurately indicate a helminth infection in fish farm. Thereby, traditional method for diagnosis such as necropsy, examination of possible infected tissues and further analysis with light microscope (wet mount or stained parasites) are the routine in laboratories (EL DEEN et al., 2018).

Final Remarks

Regarding the immune response of teleost fish to infection by helminths, we observe that researchers have mainly evaluated the action of the IIS towards elimination of parasites belonging to the different groups. Rodlet cells and mast cells, accompanied by neutrophils and macrophages, are the main types of cells that have been described in infections caused by all groups of helminths. Hyperplasia and increased numbers of mucous cells in response to infection have also been observed, such that parasites become coated with the mucus thus produced. The importance of mucus in the immune response to infection is due to the physical protection (retardation of infection) that this provides, and because mucus contains immune chemical components that are able to damage the parasites tegument. A histopathological approach regarding infections in fish caused by helminths is highly relevant because this makes it possible to ascertain the damage that helminths really cause to fish and the degree of importance that should be attributed to such infections. More recent studies have sought to detect the participation of the AIS in production of immunoglobulins that are specific for parasites and, possibly, in production of various classes of immunoglobulins for different anatomical infection sites, such as the gills, tegument or intestine. Therefore, further studies are still necessary, in relation to various species of teleost fish, in order to verify the role of the AIS in elimination of parasites and acquisition of resistance against future infections (immunological memory). Still, there are many gaps in knowledge regarding the local and

systemic immune responses that are developed by teleost fish. This hampers development of less invasive diagnoses, adequate treatments and effective prevention, especially regarding farmed fish. In addition, it is still necessary effort in development of cheaper and faster techniques for diagnoses of helminth parasites in fish, especially to those groups that are responsible for the transmission of diseases to humans. The studies for detection of helminths are more directed to its presence in human than in host fish. More approaches to helminth infection diagnosis in fish could help in prevention and in accurate treatment in cases of farmed fishes.

References

- Aaltonen TM, Valtonen ET, Jokinen EI. Humoral response of roach (*Rutilus rutilus*) to digenean *Rhipidocotyle fennica* infection. *Parasitology* 1997; 114 (3): 285-291.
- Abdelmonem AA, Metwally MM, Hussen HS, Elsheikha HM. Gross and microscopic pathological changes associated with parasitic infection in European eel (*Anguilla anguilla*, Linnaeus 1758). *Parasitol Res* 2010; 106 (2): 463–469.
- Acton RT, Weinheimer PF, Dupree HK, Russell TR, Wolcott M, Evans EE et al. Isolation and characterization of the immune macroglobulin from the paddlefish, *Polyodon spathula*. *J Biol Chem* 1971; 246 (22): 6760-6769.
- Aiken HM, Hayward CJ, Crosbie P, Watts M, Nowak BF. Serological evidence of an antibody response in farmed southern bluefin tuna naturally infected with the blood fluke *Cardicola forsteri*. *Fish Shellfish Immunol* 2008; 25 (1-2): 66-75.
- Andree KB, Roque A, Duncan N, Gisbert E, Estevez A, Tsertou MI et al. *Diplectanum sciaenae* (Van Beneden & Hesse, 1863) (Monogenea) infecting meagre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) broodstock in Catalonia, Spain. A case report. *Vet Parasitol: Regional Studies and Reports* 2015; 1:75-79.
- Andrade-Porto SM, Cárdenas MQ, Martins ML, Oliveira JKQ, Pereira JN, Araújo CSO et al. First record of larvae of *Hysterothylacium* (Nematoda: Anisakidae) with zoonotic potential in the pirarucu *Arapaima gigas* (Osteichthyes: Arapaimidae) from South America. *Brazilian Journal of Biology* 2015; 75(4): 790-795.
- Araujo CSO, Barros MC, Silva Gomes AL, Varella AMB, Moraes Viana G, Silva NP. Parasitas de populações naturais e artificiais de tucunaré (*Cichla* spp.). *Rev Bras Parasitol Vet* 2009; 18 (1): 34-38.
- Araujo CSO, Tavares-Dias M, Gomes ALS, Andrade SMS, Lemos JRG, Oliveira AT et al. Infecções parasitárias e parâmetros sanguíneos em *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) cultivados no estado do Amazonas, Brasil. In: Tavares-Dias M (Org.). *Manejo*

e Sanidade de Peixes em Cultivo. 1 ed. Macapá, AP: Embrapa Amapá; 2009. p. 389-424.

Bahloul QZ, Skovgaard A, Kania PW, Buchmann K. Effects of excretory/secretory products from *Anisakis simplex* (Nematoda) on immune gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol* 2013; 35 (3): 734-739.

Bartoli P, Boudouresque Cf. Effect of the digenean parasites of fish on the fauna of Mediterranean lagoons. *Parassitologia* 2007; 49 (3): 111-117.

Belo MAA, Souza DGF, Faria VP, Prado EJ, Moraes FR, Onaka EM. Haematological response of curimbas *Prochilodus lineatus*, naturally infected with *Neoechinorhynchus curemai*. *J Fish Biol* 2013; 82 (4): 1403-1410.

Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007; 81 (1): 1-5.

Bosi G, Shinn AP, Giari L, Simoni E, Pironi F, Dezfuli BS. Changes in the neuromodulators of the diffuse endocrine system of the alimentary canal of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), naturally infected with *Eubothrium crassum* (Cestoda). *J Fish Dis* 2005; 28 (12): 703-711.

Bowden TJ, Cook P, Rombout JHWM. Development and function of the thymus in teleosts. *Fish Shellfish Immunol* 2005; 19 (5): 413-427.

Bowden TJ. Modulation of the immune system of fish by their environment. *Fish Shellfish Immunol* 2008; 25 (4): 373-383.

Bromage ES, Kaattari IM, Zwollo P, Kaattari SL. Plasmablast and plasma cell production and distribution in trout immune tissues. *J Immunol* 2004; 173 (12): 7317-7323.

Buchmann K, Lindenstrøm T. Interactions between monogenean parasites and their fish hosts. *Int J Parasitol* 2002; 32 (3): 309-319.

Buchmann K, Mehrdana F. Effects of anisakid nematodes *Anisakis simplex* (sl), *Pseudoterranova decipiens* (sl) and *Contracaecum osculatum* (sl) on fish and consumer health. *Food and Waterborne Parasitology* 2016; 4: 13-22.

Buchmann K, Pedersen LØ, Glamann J. Humoral immune response of European eel *Anguilla anguilla* to a major antigen in *Anguillicola crassus* (Nematoda). *Dis Aquat Org* 1991; 12 (1): 55-57.

Buchmann K. Binding and lethal effect of complement from *Oncorhynchus mykiss* on *Gyrodactylus derjavini* (Platyhelminthes: Monogenea). *Dis Aquat Org* 1998; 32 (3): 195-200.

Cai XQ, Xu MJ, Wang YH, Qiu DY, Liu GX, Lin A et al. Sensitive and rapid detection of *Clonorchis sinensis* infection in fish by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Parasitology research* 2010; 106(6): 1379-1383.

Cammilleri G, Chetta M, Costa A, Graci S, Collura R, Buscemi MD et al. Validation of the

TrichinEasy® digestion system for the detection of Anisakidae larvae in fish products. *Acta Parasitol* 2016; 61(2): 369-375.

Campos CM, Moraes JR, Moraes EFR. Histopatologia de fígado, rim e baço de *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* e *Pseudoplatystoma fasciatum* parasitados por myxosporídios, capturados no Rio Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2008; 17 (4): 200-205.

Cavalcanti ETS, Takemoto RM, Alves LC, Chellappa S. First report of metazoan fish parasites with zoonotic potential in *Scomberomorus brasiliensis* and *Trichiurus lepturus* from the coastal waters of Rio Grande do Norte, Brazil. *Marine Biodiversity Records* 2012; 5: 1-4.

Chai JY, Murrell KD, Lymbery AJ. Fish-borne parasitic zoonoses: status and issues. *Internat J Parasitol* 2005; 35 (11-12): 1233-1254.

Constenla M, Carrassón M, Moyà CM, Fernández-Chacón A, Padrós F, Repullés-Albelda A et al. Parasitisation by *Bathycerca elongatum* (Digenea, Opecoelidae) in pyloric caeca of *Trachyrincus scabrus* (Teleostei, Macrouridae). *Dis Aquat Org* 2011; 96 (3): 239-247.

Coscia MR, Oreste U. Plasma and bile antibodies of the teleost *Trematomus bernacchii* specific for the nematode *Pseudoterranova decipiens*. *Dis Aquat Org* 2000; 41 (1):37-42.

Coscia MR, Oreste U. Presence of antibodies specific for proteins of *Contracaecum osculatum* (Rudolphi, 1908) in plasma of several Antarctic teleosts. *Fish Shellfish Immunol* 1998; 8 (4): 295-302.

Costa MM, Maehr T, Diaz-Rosales P, Secombes CJ, Wang, T. Bioactivity studies of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interleukin-6: effects on macrophage growth and antimicrobial peptide gene expression. *Mol Immunol* 2011; 48 (15-16): 1903-1916.

Costa OTF, Dias LC, Malmann CSY, Lima Ferreira CA, Carmo IB, Wischneski AG. The effects of stocking density on the hematology, plasma protein profile and immunoglobulin production of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) farmed in Brazil. *Aquaculture* 2019; 499: 260-268.

Cooper MD, Alder MN. The evolution of adaptive immune systems. *Cell* 2006; 124 (4): 815-822.

Danilova N, Bussmann J, Jekosch K, Steiner LA. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nat Immunol* 2005; 6 (3): 295.

Decostere A, Haesebrouck F, Turnbull JF, Charlier G. Influence of water quality and temperature on adhesion of high and low virulence *Flavobacterium columnare* strains to isolated gill arches. *J Fish Diseases* 1999; 22 (1): 1-11.

Dezfuli BS, Bo T, Lorenzoni M, Shinn AP, Giari L. Fine structure and cellular responses at the host-parasite interface in a range of fish-helminth systems. *Vet Parasitol* 2015; 208 (3-4): 272-279.

- Dezfuli BS, Bosi G, DePasquale JA, Manera M, Giari L. Fish innate immunity against intestinal helminths. *Fish Shellfish Immunol* 2016; 50: 274–287.
- Dezfuli BS, DePasquale JA, Castaldelli G, Giari L, Bosi G. A fish model for the study of the relationship between neuroendocrine and immune cells in the intestinal epithelium: *Silurus glanis* infected with a tapeworm. *Fish Shellfish Immunol* 2017; 64: 243-250.
- Dezfuli BS, Giari L, Lorenzoni M, Carosi A, Manera M, Bosi G. (2018). Pike intestinal reaction to *Acanthocephalus lucii* (Acanthocephala): immunohistochemical and ultrastructural surveys. *Parasit Vectors* 2018; 11(1): 424.
- Dezfuli BS, Giari L, Lui A, Squerzanti S, Castaldelli G, Shinn AP et al. (2012). Proliferative cell nuclear antigen (PCNA) expression in the intestine of *Salmo trutta trutta* naturally infected with an acanthocephalan. *Parasit Vectors* 2012; 5 (1): 198.
- Dezfuli BS, Giari L, Squerzanti S, Lui A, Lorenzoni M, Sakalli S. Histological damage and inflammatory response elicited by *Monobothrium wagneri* (Cestoda) in the intestine of *Tinca tinca* (Cyprinidae). *Parasit Vectors* 2011; 4 (1): 225.
- Dezfuli BS, Lui A, Boldrini P, Pironi F, Giari L. The inflammatory response of fish to helminth parasites. *Parasite* 2008; 15: 426–433.
- Dezfuli BS, Lui A, Pironi F, Manera M, Shinn AP, Lorenzoni M. Cell types and structures involved in tench, *Tinca tinca* (L.), defence mechanisms against a systemic digenean infection. *J Fish Diseases* 2013; 36 (6): 577-585.
- Dezfuli BS, Pironi F, Campisi M, Shinn AP, Giari L. The response of intestinal mucous cells to the presence of enteric helminths: their distribution, histochemistry and fine structure. *J Fish Diseases* 2010b; 33 (6): 481–488.
- Dezfuli BS, Pironi F, Giari L, Noga EJ. Immunocytochemical localization of piscidin in mast cells of infected seabass gill. *Fish Shellfish Immunol* 2010a; 28 (3): 476–482.
- Dezfuli BS, Pironi F, Shinn AP, Manera M, Giari, L. Histopathology and ultrastructure of *Platichthys flesus* naturally infected with *Anisakis simplex* sl larvae (Nematoda: Anisakidae). *J Parasitol* 2007; 93 (6): 1416-1423.
- Edholm ES, Bengtén E, Stafford JL, Sahoo M, Taylor EB, Miller NW et al. Identification of two IgD+ B cell populations in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *The J Immunol* 2010; 185 (7): 4082-4094.
- Ehlers U. Comments on a phylogenetic system of the Platyhelminthes. *Dev Hydrobiol* 1986; 132 (1): 1-12.
- Eiras JC, Pavanelli GC, Takemoto RM, Nawa Y. Fish-borne nematodiasis in South America: neglected emerging diseases. *J Helminthol* 2018; 92(6):649-654.
- El Deen AIN, Zaki MS, Fawzi OM. New diagnostic methods of parasitic infections in freshwater fishes. *J Adv Pharm Education & Research* 2018; 8(1): 97.

- Faliex E, Silva C, Simon G, Sasal P. Dynamic expression of immune response genes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*, experimentally infected with the monogenean *Diplectanum aequans*. *Fish Shellfish Immunol* 2008; 24 (6): 759-767.
- Fischer C, Malta JCO, Varella AMB. The fauna of parasites of the tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)(Characiformes: Characidae) from middle Solimões River and lower Amazonas River and their potential as biological indicators. *Acta Amaz* 2003; 33 (4): 651-662.
- Flajnik MF; Kasahara M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet* 2010; 11(1): 47.
- Gaines APL, Lozano LES, Viana GM, Monteiro PC, Araújo CSO. Tissue changes in the gut of *Arapaima gigas* (Schinz, 1822), infected by the nematode *Spirocamallanus inopinatus* (Travassos, 1929). *Neotrop Helminthol* 2012; 6 (2): 147-157.
- Gamboa PM, Asturias J, Martinez R, Antepara I, Jauregui I, Urrutia I et al. (2012). Diagnostic utility of components in allergy to *Anisakis simplex*. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2012; 22: 13-19.
- Ghosh J, Lun CH, Majeske AJ, Sacchi S, Schrankel CS, Smith LC. Invertebrate immune diversity. *Dev Comp Immunol* 2011; 35 (9), p. 959-974.
- Gómez GD, Balcázar JL. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 52 (2): 145-154.
- Grobbelaar A, van As LL, van As JG, Butler HJB. Pathology of eyes and brain of fish infected with diplostomids, southern Africa. *Afr Zool* 2015, 50 (2): 181-186.
- Haarder S, Kania PW, Bahlool QZ, Buchmann K. Expression of immune relevant genes in rainbow trout following exposure to live *Anisakis simplex* larvae. *Exp Parasitol* 2013; 135 (3): 564-569.
- Harris JE. The immune response of a Cyprinid fish to infections of the acanthocephalan *Pomphorhynchus laevis*. *Int J Parasitol* 1972; 2 (4): 459-469.
- Harris NL. Recent advances in type-2-cell-mediated immunity: insights from helminth infection. *Immunity* 2017; 47 (6): 1024-1036.
- Harris PD, Soleng A, Bakke TA. Killing of *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea) mediated by host complement. *Parasitology* 1998; 117 (2): 137-143.
- Hatanaka A, Umeda N, Yamashita S, Hirazawa N. A small ciliary surface glycoprotein of the monogenean parasite *Neobenedenia girellae* acts as an agglutination/immobilization antigen and induces an immune response in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Parasitology* 2005; 131 (5): 591-600.
- Heuch PA, Jansen PA, Hansen H, Sterud E, MacKenzie K, Haugen P, Hemmingsen W. Parasite faunas of farmed cod and adjacent wild cod populations in Norway: a

comparison. *Aquacult Env Interac* 2011; 2(1): 1-13.

Hirazawa N, Ishizuka R, Hagiwara H. The effects of *Neobenedenia girellae* (Monogenea) infection on host amberjack *Seriola dumerili* (Carangidae): Hematological and histopathological analyses. *Aquaculture* 2016; 461: 32–39.

Höglund J, Pilström L. Purification of adult *Anguillicola crassus* whole-worm extract antigens for detection of specific antibodies in serum from the European eel (*Anguilla anguilla*) by ELISA. *Fish Shellfish Immunol* 1994; 4 (4): 311-319.

Höglund J, Thuvander A. Indications of non-specific protective mechanisms in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* with diplostomosis. *Dis Aquat Org* 1990; 8 (2): 91-97.

Hoshino M, DF, Neves LR, Tavares-Dias M. Parasite communities of the predatory fish, *Acestrorhynchus falcatus* and *Acestrorhynchus falcirostris*, living in sympatry in Brazilian Amazon. *Rev Bras Parasitol Vet* 2016; 25(2): 207-216.

Huang B, Perrings C. Managing the risks of sea lice transmission between salmon aquaculture and wild pink salmon fishery. *Ecological Economics* 2017; 142: 228–237.

Hung N, Madsen H, Fried B. Global status of fish-borne zoonotic trematodiasis in humans. *Acta Parasitol* 2013; 58(3): 231-258.

Jaiswal N, Tripathi R, Malhotra SK. Accentuated Molecular Detection Technique to Segregate and Identify Helminths of Fish through High Resolution Melting (HRM) Analysis 2017; *Single Cell Biol*, 6(2): 1-5.

Jerônimo GT, Páuda SB, et al. *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala) infection in farmed *Colossoma macropomum*: A pathological approach. *Aquaculture* 2017; 469: 124–127.

Jones JDG, Dangi JL. The plant immune system. *Nature* 2006; 444 (7117): 323.

Karvonen A, Hudson PJ, Seppälä O, Valtonen ET (2004). Transmission dynamics of a trematode parasite: exposure, acquired resistance and parasite aggregation. *Parasitol Res* 2004; 92 (3): 183-188.

Kishimori JM, Takemura A, Leong JAC. *Neobenedenia melleni*-specific antibodies are associated with protection after continuous exposure in Mozambique Tilapia. *J Immunol Res* 2015; 2015: 6.

Knopf K, Lucius R. Vaccination of eels (*Anguilla japonica* and *Anguilla anguilla*) against *Anguillicola crassus* with irradiated L 3. *Parasitology* 2008; 135 (5): 633-640.

Kotob MH, Menanteau-Ledouble S, Kumar G, Abdelzaher M, El-Matbouli M. The impact of co-infections on fish: a review. *Vet Res* 2017; 47 (1): 98.

Kumar S, Raman RP, Prasad KP, Srivastava PP, Kumar S, Rajendran KV. Effects on haematological and serum biochemical parameters of *Pangasianodon hypophthalmus* to an

experimental infection of *Thaparocleidus* sp.(Monogenea: dactylogyridae). *Exp Parasitol* 2018; 188: 1–7.

Kumar S, Raman RP, Prasad KP, Srivastava PP, Kumar S, Rajendran KV. Effects on haematological and serum biochemical parameters of *Pangasianodon hypophthalmus* to an experimental infection of *Thaparocleidus* sp. (Monogenea: dactylogyridae). *Exp Parasitol* 2018; 188: 1-7.

Kundu I, Bandyopadhyay PK, Mandal DR, Gürelli G. (2016). Study of pathophysiological effects of the nematode parasite *Eustrongylides* sp. on Freshwater fish *Channa punctatus* by hematology, serum biochemical, and histological studies. *Türkiye Parazitol Deri* 2016; 40(1): 42.

Leung TL, Bates AE. More rapid and severe disease outbreaks for aquaculture at the tropics: implications for food security. *J Appl Ecol* 2013; 50 (1): 215–222.

Li WX, Zou H, Wu SG, Xiong F, Li M, Ma XR et al. Composition and diversity of communities of *Dactylogyrus* spp. in wild and farmed goldfish *Carassius auratus*. *J Parasitol* 2018; 104(4): 353-359.

Lieschke GJ, Trede NS. Fish immunology. *Curr Biol* 2009; 19 (16): 678–682.

Lugo-Villarino G, Balla KM, Stachura DL, Bañuelos K, Werneck MBF, Traver D. Identification of dendritic antigen-presenting cells in the zebrafish. *Proc Natl Acad Sci* 2010; 107 (36): 15850–15855.

Luque JL. Biologia, epidemiologia e controle de parasitos de peixes. *Rev Bras Parasitol Vet* 2004; 13 (1): 161–165.

Magnadottir B. Immunological control of fish diseases. *Mar Biotechnol* 2010; 12 (4): 361–379.

Magnadóttir B. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol* 2006; 20 (2): 137–151.

Malta, JCO, Gomes ALS, Andrade SMS, Varella AMB. Infestações maciças por acantocéfalos, *Neoechinorhynchus buttnerae* Golvan, 1956, (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) em tambaquis jovens, *Colossoma macropomum* (cuvier, 1818) cultivados na Amazônia Central. *Acta Amaz* 2001; 31 (1): 133–143.

Marinho RDGB, Tostes LV, Borges M, Yoshioka ETO, Tavares-Dias M. Respostas hematológicas de *Arapaima gigas* (Pisces: Arapaimidae) parasitados naturalmente por protozoários e metazoários. *Biota Amazônia* 2015; 5(1): 105-108.

Martin SAM, Król E. Nutrigenomics and immune function in fish: new insights from omics technologies. *Dev Comp Immunol* 2017; 75: 86–98.

Martins ML, Moraes FR, Fujimoto RY, Onaka EM, Quintana CIF. Prevalence and histopathology of *Neoechinorhynchus curemai* Noronha, 1973 (Acanthocephala:

Neoechinorhynchidae) in *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1836 from Volta Grande Reservoir, MG, Brazil. *Braz J Biol* 2001; 61 (3): 517–522.

Martins ML, Tavares-Dias M, Janik AJ, Kent ML, Jerônimo GT. Hematology and condition factor of tui chub and fathead minnow parasitized by nematode from Upper Klamath Lake, Oregon, USA. *Diseases of aquatic organisms* 2017; 126(3): 257-262.

Mashoof S, Criscitiello M. Fish immunoglobulins. *Biology* 2016; 5 (4): 45.

Matos LV, Oliveira MIB, Gomes ALS, Silva GS. Morphological and histochemical changes associated with massive infection by *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) in the farmed freshwater fish *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 from the Amazon State, Brazil. *Parasitol Res* 2017; 116 (3): 1029-1037.

Matsuyama, T, Fujiwara A, Nakayasu C, Kamaishi T, Oseko N, Tsutsumi N et al. Microarray analyses of gene expression in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* leucocytes during monogenean parasite *Neoheterobothrium hirame* infection. *Dis Aquat Org* 2007; 75 (1): 79-83.

Mazur OE, Tolochko LV. Cytomorphological and biochemical characteristics of the whitefish, Baikal omul *Coregonus migratorius*, infected by plerocercoids of *Diphyllbothrium dendriticum* (Cestoda: Pseudophyllidae). *Biol Bull* 2015; 42 (2): 117–123.

Mazur OE, Tolochko LV. Cytomorphological and biochemical characteristics of the whitefish, Baikal omul *Coregonus migratorius*, infected by plerocercoids of *Diphyllbothrium dendriticum* (Cestoda: Pseudophyllidae). *Biol Bull* 2015; 42 (2): 117-123.

Mazzanti C, Monni G, Cognetti V. Observations on antigenic activity of *Pseudodactylogyrus anguillae* (Monogenea) on the European eel (*Anguilla anguilla*). *Bull Europ Assoc Fish Pathol* 1999; 19 (2): 57-59.

Mcarthur CP. Humoral antibody production by New Zealand eels, against the intestinal trematode *Telogaster opisthorchis* Macfarlane, 1945. *J Fish Dis* 1978; 1 (4): 377-387.

Mdegela RH, Omary AN, Mathew C, Nonga HE. Effect of pond management on prevalence of intestinal parasites in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under small scale fish farming systems in Morogoro, Tanzania. *Livestock Research for Rural Development* 2011; 23 (6): 127-132.

Melo FTV, Rodrigues RAR, Giese EG, Gardner SL, Santos JN. Histopathologic aspects in *Plagioscion squamosissimus* (HECKEL, 1940) induced by *Neoechinorhynchus veropesoi*, metacestodes and anisakidae juveniles. *Rev Bras Parasitol Vet* 2014; 23 (2): 224–230.

Mladineo I, Block BA. Expression of cytokines IL-1 β and TNF- α in tissues and cysts surrounding *Didymocystis wedli* (Digenea, Didymozoidae) in the Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Fish Shellfish Immunol* 2010; 29 (3): 487–493.

Mladineo I, Zrnčić S, Oraić D. Severe helminthic infection of the wild brown trout (*Salmo*

- trutta*) in Cetina River, Croatia. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 2009; 29 (3): 86–91.
- Molnár K, Majoros G, Csaba G, Székely C. Pathology of *Atractolytocestus huronensis* Anthony, 1958 (Cestoda, Caryophyllaeidae) in Hungarian pond-farmed common carp. *Acta Parasitol* 2003; 48: 222–228.
- Molnár K. Histopathological changes caused by the metacestodes of *Neogryporhynchus cheilancristrotus* (Wedl, 1855) in the gut of the gibel carp, *Carassius gibelio*. *Acta Vet Hung* 2005; 53 (1): 45–52.
- Morley NJ, Hoole D. Ultrastructural studies on the host-parasite interface between *Khawia sinensis* (Cestoda: Caryophyllidea) and carp *Cyprinus carpio*. *Dis Aquat Org* 1995; 23 (2): 93–99.
- Nazir S, Ali MN, Chishti MZ. Purification and Characterization of *Pomphorhynchus kashmirensis* Somatic Antigens Collected from Naturally Infected Local Fish *Schizothorax*. *N Y Sci J* 2013; 6 (7): 24–28.
- Nie, P.; Hoole, D. Antibody response of carp, *Cyprinus carpio* to the cestode, *Bothriocephalus acheilognathi*. *Parasitology* 1999; 118 (6): 635–639.
- Nielsen ME, Buchmann K. Glutathione-s-transferase is an important antigen in the eel nematode *Anguillicola crassus*. *J Helminthol* 1997; 71 (4): 319–324.
- Oba ET, Mariano WS, Santos LRB. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. In: Tavares-Dias M. *Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo*. Macapá: Embrapa; 2009. p. 57–71.
- Ogawa K, Yoshinaga T, Wakabayashi H. Acquired protection against *Neobenedenia girellae* in Japanese flounder. *Fish Pathol* 1995; 30 (3): 233–238.
- Ogawa K. Diseases of cultured marine fishes caused by Platyhelminthes (Monogenea, Digenea, Cestoda). *Parasitology* 2015; 142 (1): 178–195.
- Olabuenaga SE. Sistema inmune en peces. *Gayana* 2000; 64 (2): 205–215.
- Polinski M, Shirakashi S, Bridle A, Nowak B. Transcriptional immune response of cage-cultured Pacific bluefin tuna during infection by two *Cardicola* blood fluke species. *Fish Shellfish Immunol* 2014; 36 (1): 61–67.
- Press CM, Evensen Ø. The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish Shellfish Immunol* 1999; 9 (4): 309–318.
- Priebe K, Huber C, Märklbauer E, Terplan G. (1991). Detection of antibodies against the larva of *Anisakis simplex* in the pollock *Pollachius virens* using ELISA. *J Vet Med B* 1991; 38 (3): 209–214.
- Pylkkö P, Suomalainen LR, Tirola M, Valtonen ET. Evidence of enhanced bacterial invasion during *Diplostomum spathaceum* infection in European grayling, *Thymallus thymallus* (L.). *J*

Fish Diseases 2006; 29 (2): 79–86.

Rauta PR, Nayak B, Das S. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms. *Immunol Lett* 2012; 148 (1): 23–33.

Reite OB, Evensen Ø. Inflammatory cells of teleostean fish: a review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. *Fish Shellfish Immunol* 2006; 20 (2): 192–208.

Reyes-Becerril M, Alamillo E, Trasviña A, Hirono I, Kondo H, Jirapongpairroj W et al. In vivo and in vitro studies using larval and adult antigens from *Neobenedenia melleni* on immune response in yellowtail (*Seriola lalandi*). *J Fish Dis* 2017; 40 (11): 1497-1509.

Roberts ML, Lewis JW, Wiegertjes GF, Hoole D. Interaction between the blood fluke, *Sanguinicola inermis* and humoral components of the immune response of carp, *Cyprinus carpio*. *Parasitology* 2005; 131 (2): 261–271.

Rodrigues MV, Pantoja JCF, Guimarães CDO, Benigno RNM, Palha MDDC, Biondi, GF. Prevalence for nematodes of hygiene-sanitary importance in fish from Colares Island and Vigia, Pará, Brasil. *Rev Bras Ciênc Vet* 2015; 22(2): 124-128.

Rocha MJS, Jerônimo GT, Costa OTFD, Malta JCDO, Martins ML, Maciel PO et al. Changes in hematological and biochemical parameters of tambaqui (*Colossoma macropomum*) parasitized by metazoan species. *Rev Bras Parasitol Vet* 2018; 27 (4): 488-484.

Rombout JHWM, Abelli L, Picchietti S, Scapigliati G, Kiron V. Teleost intestinal immunology. *Fish Shellfish Immunol* 2011; 31 (5): 616–626.

Rombout JHWM, Yang G, Kiron V. Adaptive immune responses at mucosal surfaces of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol* 2014; 40 (2): 634–643.

Roon SR, Alexander JD, Jacobson KC, Bartholomew JL. Effect of *Nanophyetus salmincola* and bacterial co-infection on mortality of juvenile Chinook Salmon. *J Aquat Anim Health* 2015; 27(4): 209-216.

Rubio-Godoy M, Sigh J, Buchmann K, Tinsley RC. Antibodies against *Discocotyle sagittata* (Monogenea) in farmed trout. *Dis Aquat Org* 2003; 56 (2): 181–184.

Salinas I, Zhang YA, Sunyer JO. Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Dev Comp Immunol* 2011; 35(12): 1346–1365.

Salvador R, Muller EE, Leonhardt JH, Pretto-Giordano LG, Dias JA, Freitas JC et al. Isolamento de *Streptococcus* spp. de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e qualidade da água de tanques rede na Região Norte do Estado do Paraná, Brasil. *Semina: Ciênc Agrár* 2003; 24 (1): 35–42.

Sandoval-Gío JJ, Rodríguez-Canul R, Vidal-Martínez VM. Humoral antibody response of the tilapia *Oreochromis niloticus* against *Cichlidogyrus* spp.(Monogenea). *J Parasitol* 2008; 94 (2): 404–409.

- Santos RBS, Tavares-Dias M. Células sanguíneas e resposta hematológica de *Oxydoras niger* (Pisces, Doradidae) oriundos da bacia do médio Rio Solimões, estado do Amazonas (Brasil), naturalmente parasitados. *Bol. Inst. Pesca* 2010; 36 (4): 283–292.
- Schmidt-Posthaus H, Steiner P, Müller B, Casanova-Nakayama A. Complex interaction between proliferative kidney disease, water temperature and concurrent nematode infection in brown trout. *Dis Aquat Organ* 2013; 104: 23–34
- Secombes CJ, Wang T. The innate and adaptive immune system of fish. In: Austin B. *Infectious Diseases in Aquaculture: Prevention and Control*. 1st ed. Woodhead Publishing; 2012: p. 3–68.
- Secombes CJ, Wang T, Hong S, Peddie S, Crampe M, Laing KJ et al. Cytokines and innate immunity of fish. *Dev Comp Immunol* 2001; 25 (8–9): 713–723.
- Secombes CJ. The nonspecific immune system: cellular defenses. In: Iwama G, Nakanishi T. *The fish immune system: organism, pathogen and environment*. San Diego: Academic Press; 1996. p. 63–103.
- Shah AW, Parveen M, Mir SH, Sarwar SG, Yousuf AR. Impact of helminth parasitism on fish haematology of Anchar Lake, Kashmir. *Pakistan J Nutr* 2009; 8 (1): 42–45.
- Sharp GJE, Pike AW, Secombes CJ. Sequential development of the immune response in rainbow trout [*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)] to experimental plerocercoid infections of *Diphyllbothrium dendriticum* (Nitzsch, 1824). *Parasitology* 1992; 104 (1): 169–178.
- Sharp GJE, Pike AW, Secombes CJ. The immune response of wild rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to naturally acquired plerocercoid infections of *Diphyllbothrium dendriticum* (Nitzsch, 1824) and *D. ditremum* (Creplin, 1825). *J Fish Biol* 1989; 35 (6): 781–794.
- Sitjà-Bobadilla A. Living off a fish: a trade-off between parasites and the immune system. *Fish Shellfish Immunol* 2008; 25 (4): 358–372.
- Slotved HC, Buchmann K. Acquired resistance of the eel, *Anguilla anguilla* L., to challenge infections with gill monogeneans. *J Fish Dis* 1993; 16 (6): 585–591.
- Sripa B, Kaewkes S, Sithithaworn P, Mairiang E, Laha T, Smout M et al. Liver fluke induces cholangiocarcinoma. *PLoS Med* 2007; 4(7): e201.
- Sripa B, Kaewkes S, Intapan PM, Maleewong W, Brindley PJ. Food-borne trematodiasis in Southeast Asia: epidemiology, pathology, clinical manifestation and control. In: Xiao-Nong Zhou et al. *Advances in Parasitology*. Academic Press; 2010: 305–350.
- Stables JN, Chappell LH. Putative immune response of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, to *Diplostomum spathaceum* infections. *J Fish Biol* 1986; 29 (1): 115–122.

Szalai AJ, Danell GV, Dick TA. Intestinal leakage and precipitating antibodies in the serum of quillback, *Carpiodes cyprinus* (Lesueur), infected with *Neoechinorhynchus carpiodi* Dechtiar, 1968 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae). *J Parasitol* 1988; 415–420.

Szwejsjer E, Verburg-van Kemenade, BML, Maciuszek M, Chadzinska M. Estrogen-dependent seasonal adaptations in the immune response of fish. *Horm Behav* 2017; 88: 15–24.

Tavares-Dias M, Martins ML. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. *J Parasit Dis* 2017; 41 (4): 913–918.

Tavares-Dias M, Moraes FR, Martins ML. Hematological assessment in four Brazilian teleost fish with parasitic infections, collected in feefishing from Franca, São Paulo, Brazil. *Bol Inst Pesca* 2008; 34:189-196.

Thatcher VE. The isopod parasites of South American fishes. Salgado-Maldonado G, Garcia Aldrete AN, Vidal-Martinez VM. *Metazoan in the Neotropics: A Systematic and Ecological Perspective*. México: Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México; 2000. p. 193–226.

Thoney DA, Hargis Jr WJ. Monogenea (Platyhelminthes) as hazards for fish in confinement. *Ann Rev Fish Dis* 1991; 1: 133–153.

Tort L. Stress and immune modulation in fish. *Dev Comp Immunol* 2011; 35 (12):1366–1375.

Uribe C, Folch H, Enriquez R, Moran G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Vet Med Czech* 2011; 56 (10): 486–503.

Ventura AS, Gabriel AMA, Saravy TM, Cavichiolo F. Descrição histopatológica das lesões intestinais de híbrido patinga parasitado. *Rev Ciên Vet Saúde Púb* 2017; 4 (1): 2–8.

Violante-González J, García-Varela M, Rojas-Herrera A, Guerrero SG. (2009). Diplostomiasis in cultured and wild tilapia *Oreochromis niloticus* in Guerrero State, Mexico. *Parasitol Res* 2009; 105(3): 803.

Wang G, Kim JH, Sameshima M, Ogawa K. Detection of antibodies against the monogenean *Heterobothrium okamotoi* in tiger puffer by ELISA. *Fish Pathol* 1997; 32 (3): 179-180.

Wanstall ST, Robotham PWJ, Thomas JS. Pathological changes induced by *Pomphorhynchus laevis* Muller (Acanthocephala) in the gut of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 1986; 72 (1): 105–114.

Watts M, Munday BL, Burke CM. Immune responses of teleost fish. *Aust Vet J* 2001; 79 (8): 570–574.

Whyte SK, Chappell LH, Secombes CJ. Protection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Richardson), against *Diplostomum spathaceum* (Digenea): the role of specific antibody and activated macrophages. *J Fish Dis* 1990; 13 (4): 281–291.

- Whyte SK. The innate immune response of finfish—a review of current knowledge. *Fish Shellfish Immunol* 2007; 23 (6): 1127–1151.
- Wiegertjes GF, Forlenza M, Joerink M, Scharsack JP. Parasite infections revisited. *Dev Comp Immunol* 2005; 29 (9): 749–758.
- Williams MA, Hoole D. Antibody response of the fish *Rutilus rutilus* to the metacestode of *Ligula intesinalis*. *Dis Aquat Org* 1992; 12: 83-89.
- Woo PTK, Leatherland JF, Bruno DW. *Fish Diseases and Disorders*. CABI, 2011.
- Wood BP, Matthews RA. The immune response of the thick-lipped grey mullet, *Chelon labrosus* (Risso, 1826), to metacercarial infections of *Cryptocotyle lingua* (Creplin, 1825). *J Fish Biol* 1987; 31: 175–183.
- Xu Z, Parra D, Gómez D, Salinas I, Zhang YA, von Gersdorff Jørgensen L et al. Teleost skin, an ancient mucosal surface that elicits gut-like immune responses. *Proc Natl Acad Sci* 2013; 110 (32): 13097–13102.
- Ye J, Kaatari IM, Ma C, Kaatari S. The teleost humoral immune response. *Fish Shellfish Immunol* 2013; 35 (6): 1719–1728.
- Zapata A1, Diez B, Cejalvo T, Gutiérrez-de Frías C, Cortés A. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol* 2006; 20 (2): 126–136.
- Zhang YA, Salinas I, Li J, Parra D, Bjork S, Xu Z, LaPatra SE, Bartholomew J, Sunyer JO. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nat Immunol* 2010; 11 (9): 827.
- Zhang YA, Salinas I, Oriol Sunyer J. Recent findings on the structure and function of teleost IgT. *Fish Shellfish Immunol* 2011; 31 (5): 627–634.
- Zhou S, Li WX, Zou H, Zhang J, Wu SG, Li M et al. Expression analysis of immune genes in goldfish (*Carassius auratus*) infected with the monogenean parasite *Gyrodactylus kobayashii*. *Fish Shellfish Immunol* 2018; 77: 40-45.
- Zhu LY, Pan PP, Fang W, Shao JZ, Xiang LX. Essential role of IL-4 and IL-4R α interaction in adaptive immunity of zebrafish: insight into the origin of Th2-like regulatory mechanism in ancient vertebrates. *J Immunol* 2012; 188 (11): 5571–5584.

Capítulo II

Purificação parcial e titulação de imunoglobulinas no muco intestinal de *Colossoma macropomum* não infectados e infectados por *Neoechinorhynchus buttnerae*

Artigo conforme a revista: Fish & Shellfish
Immunology ISSN (eletrônico): 1050-4648.
Frequência: mensal.

Partial purification and titration of immunoglobulin in gut mucus of *Colossoma macropomum* infected and uninfected by *Neoechinorhynchus buttnerae*

Purificação parcial e titulação de imunoglobulinas no muco intestinal de *Colossoma macropomum* não infectados e infectados por *Neoechinorhynchus buttnerae*

Damy Caroline de Melo Souza ¹

Edsandra Campos Chagas ²

Rafael Luckwu de Sousa³

Ilia Gilmaria Carvalho dos Santos³

Maria Cristina dos Santos³

¹ Programa de Pós-Graduação de Ciências Pesqueiras nos Trópicos, Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

² Embrapa Amazônia Ocidental, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

³ Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Abstract: Tambaqui (*Colossoma macropomum*) is a native fish of the Amazon basin that has been successfully cultivated in Brazilian fish farms. However, it is very susceptible to infections by the acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae*. As a main response to infections, fish increases mucus production on mucosal surfaces where are released immunoglobulins, the main mediators of the immune response adaptive to infection. The method of purification of immunoglobulins by caprylic acid is recommended for mammalian plasma and has recently been used for tambaqui plasma. However, there are still no studies using this method for purification of fish mucus. The objective of this study was to purify, by the caprylic acid method, and to titrate the immunoglobulins present in the intestinal mucosa of the tambaquis infected and uninfected by *N. buttnerae*. Intestinal mucosa of infected and uninfected tambaqui was collected by scraping the intestine washed in saline water. Caprylic acid at 8.7% concentration was added to samples of mucus in pH 6 and after that, the mucus was centrifuged for 30 minutes at 14000 rpm. The supernatant containing the

immunoglobulins was subjected to SDS-PAGE electrophoresis. Samples were diluted in buffers with and without 2-mercaptoethanol, to dissociate the light and heavy chains from the immunoglobulins, and applied to the electrophoresis gel. Next, the gel was stained with Coomassie bright blue. Bands with molecular mass corresponding to the immunoglobulins (~200 kDa) were revealed and the bands with reduction exhibited light chain (~ 30 kDa) and heavy (~ 70 kDa) profiles. Confirmation of the presence of immunoglobulins was obtained by the Western blot method, in which the total anti-immunoglobulin serum antibodies were used, indicating that these body fluids have equal immunoglobulin classes. For titration, Dot-ELISA method was used and revealed a higher expression of immunoglobulins in the intestinal mucus of tambaquis infected with *N. buttnerae* (Mann-Whitney, $p < 0.05$), with high titers of immunoglobulins in these animal compared to those uninfected.

Keywords: electrophoresis, antibody, caprylic acid, parasite, fish

Resumo: O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é um peixe nativo da bacia Amazônica que tem sido cultivado com sucesso nas pisciculturas brasileiras, no entanto, é muito susceptível às infecções pelo acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae*. Como principal resposta às infecções, os peixes aumentam a produção de muco nas superfícies mucosas, onde pode-se encontrar imunoglobulinas que são as principais mediadoras da resposta imune adaptativa à infecção. O método de purificação de imunoglobulinas pelo ácido caprílico é recomendado para o plasma de mamíferos e foi empregado recentemente para o plasma de tambaqui. Porém, ainda não há trabalhos que utilizem esse método para o muco de peixes. O objetivo deste estudo foi purificar, pelo método do ácido caprílico, e titular as imunoglobulinas presentes na mucosa intestinal dos tambaquis infectado e não infectado pelo *N. buttnerae*. Assim, o muco intestinal de tambaqui infectado e não infectado foi coletado pela raspagem do intestino lavado em salina. Foi realizado um *pool* com amostras do muco de cada animal e o acréscimo de ácido caprílico na concentração de 8,7% às amostras de muco em pH 6. Após isto, o muco foi centrifugado por 30 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante contendo as imunoglobulinas foi submetido à eletroforese SDS-PAGE. As amostras foram diluídas em tampões sem e com 2-mercaptoetanol, para dissociar as cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas, e aplicadas ao gel. Após coloração com Comassie brilhante blue, foram reveladas bandas com massa molecular correspondente às imunoglobulinas (~200 kDa) e as bandas com redução apresentam perfis semelhantes à cadeia leve (~30 kDa) e pesada (~70 kDa). A confirmação da presença de imunoglobulinas foi obtida pelo método de Western blot,

no qual utilizou-se os anticorpos anti-imunoglobulinas totais séricos, indicando que esses fluidos corpóreos apresentam classes iguais de imunoglobulinas. Para titulação, o método Dot-ELISA foi empregado e revelou maior expressão de imunoglobulinas no muco intestinal dos tambaquis infectados pelo *N. buttnerae* (Mann-Whitney, $p < 0.05$), observando-se altos títulos de imunoglobulinas nestes animais.

Palavras-chave: eletroforese, anticorpo, ácido caprílico, parasito, peixe

1. Introdução

As imunoglobulinas (Ig) são as principais mediadoras da resposta imune específica. São responsáveis pelo reconhecimento, neutralização, opsonização ou a ativação do Sistema Complemento o que auxilia na eliminação de patógenos ou de toxinas [4]. Essas moléculas proteicas podem estar ligadas à superfície dos linfócitos B atuando como receptores de antígenos ou também serem secretadas pelos plasmoblastos e plasmócitos no sangue e em outros fluidos corporais, como a bile e o muco, desempenhando funções diversas de acordo com a classe à qual pertençam [4,5]. Estruturalmente, assim como nos mamíferos, as imunoglobulinas dos peixes teleósteos são formadas por duas cadeias leves (CL) e duas cadeias pesadas (CH), unidas por pontes dissulfeto.

As classes de imunoglobulinas são definidas pelo domínio C (constante ou cristalizável) nas suas cadeias pesadas que determinam a função efetora da molécula, enquanto o domínio V (variável) participa do reconhecimento e neutralização de antígenos [6]. Nos peixes teleósteos, já foram identificadas três classes de imunoglobulinas: IgM [7], mais abundante no plasma, mas também presente no muco, a IgT/IgZ [8–10] associada à imunidade da mucosa [11] e IgD [12] encontrada no plasma e também no rim anterior e posterior, baço e brânquias [13], porém sua função ainda precisa ser completamente elucidada.

Dentre os locais onde essas imunoglobulinas são expressas, as superfícies mucosas são de particular interesse, pois estão em contato direto com o ambiente e, portanto, mais suscetíveis aos patógenos. O tecido linfoide associado a mucosa (MALT) pode ser subdividido conforme sua localização anatômica em: NALT, tecido linfoide associado à nasofaringe, SALT, tecido linfoide associado à pele; GIALT, tecido linfoide associado às brânquias e GALT, tecido linfoide associado ao intestino [14]. Tais tecidos apresentam particularidades que os diferem entre si e interagem com a microbiota comensal [15], contribuindo para manutenção da homeostase do animal.

Recobrando as superfícies mucosas, o muco produzido pelas células caliciformes é rico em substâncias antimicrobianas, como lectinas, proteínas inibidoras e lisozimas, além de anticorpos [16]. Assim, a produção de muco é de extrema importância para a formação de uma barreira físico-química a possíveis patógenos, sendo também um dos principais mecanismos de resposta às infecções [17]. Além disso, em diferentes espécies de teleósteos, foi observado o aumento dos níveis de imunoglobulinas nas mucosas e no

plasma após uma infecção [11,18,19], e em alguns casos, a resistência a uma reinfecção foi adquirida [20,21].

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma espécie de peixe nativo amazônico cuja produção tem crescido na piscicultura brasileira, sendo o segundo peixe mais cultivado do país [22]. Nos últimos anos, os registros de infecção pelo acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae* tem sido recorrente nas criações de tambaqui, sendo observadas altas taxas de infecções nas pisciculturas [23–26]. Ainda há poucas informações quanto à resposta imune do tambaqui a infecções por este parasito, sendo a resposta inflamatória a mais caracterizada até o momento [24,25].

A purificação de imunoglobulinas (ou anticorpos) em fluidos corporais é primordial para caracterização de suas classes, contribuindo assim, para o desenvolvimento de estratégias profiláticas como a vacinação. Dentre as técnicas utilizadas, para a purificação de imunoglobulinas séricas, o método do ácido caprílico foi primeiramente descrito por Steinbuch & Audran, (1969), sendo, desde então, cada vez mais usado na purificação de anticorpos, principalmente em mamíferos [1,2]. O ácido caprílico, ou ácido octanoico, é um ácido graxo que interage com as proteínas presentes no soro, ligando-se a sítios específicos das proteínas e formando complexos macromoleculares, que resultam em uma cascata de precipitação [3]. As imunoglobulinas não se agregam com o restante do precipitado permanecendo na fase líquida. Isto permite que um grau de pureza alto seja alcançado com baixos custos e uma metodologia simples.

Os métodos para purificação e caracterização das classes de anticorpos ou de outras moléculas associadas à resposta imune adaptativa foram realizados principalmente com espécies marinhas, havendo escassez de trabalhos para as espécies nativas de água doce [27–29]. Portanto, considerando a importância do muco na resposta imune a infecções e a participação das imunoglobulinas na mediação da resposta imune adaptativa, este trabalho teve por objetivo realizar a purificação das imunoglobulinas totais do muco intestinal de tambaqui pelo método do ácido caprílico e avaliar as possíveis diferenças nos perfis de proteínas e títulos das imunoglobulinas em animais infectados e não infectados por *Neoechinorhynchus buttnerae*.

2. Material e métodos

2.1. Animais experimentais

Exemplares de tambaqui, *Colossoma macropomum*, foram adquiridos em fazenda comercial e transportados para o setor de piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM. Os peixes foram aclimatados em tanques de 1000L com aeração constante e aquecimento, pelo período de duas semanas, sendo alimentados com ração comercial extrusada (32% PB) duas vezes ao dia. Ao fim da aclimação, foi realizada a biometria sendo o peso e comprimento padrão dos peixes $519,35 \pm 227,63$ g e $25,53 \pm 4,47$ cm, respectivamente. Os parâmetros de qualidade de água como temperatura ($28,8 \pm 0,35$ °C), oxigênio ($5,48 \pm 0,19$ mg L⁻¹) e pH ($5,72 \pm 0,04$) foram monitorados com uso de oxímetro (YSI Pro20 oxygen meter, YSI Inc., USA) e pHmetro digital (YSI F-1100 digital pH meter, YSI Inc., USA). Os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho estão de acordo com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2018) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Amazônia Ocidental e está registrado com o nº 08/2018.

2.2. Coleta do muco intestinal

Tambaquis infectados (n=10) e não infectados (n=10) por *Neoechinorhynchus buttnerae* foram utilizados para a coleta de muco intestinal, visando à purificação das imunoglobulinas presentes. Os peixes ficaram em jejum por 24h, e então foram anestesiados com eugenol (5 mgL⁻¹) em banho de imersão, eutanasiados por perfuração craniana (CONCEA, 2018), dissecados, os intestinos removidos e colocados em placas de Petri contendo solução salina 0,9%. O intestino foi aberto longitudinalmente e examinado para verificar a presença ou ausência do parasito. Amostras do muco intestinal foram coletadas por meio de raspagem do intestino com o auxílio de uma lâmina. Nos animais infectados, os parasitos eram retirados antes da coleta do muco e fixados em formol 5 %. Após isso, o muco foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos e coletado para estocagem em freezer -80 °C, até o momento do uso.

2.3. Purificação das imunoglobulinas

A purificação das imunoglobulinas presentes no muco foi realizada conforme método descrito por Steinbuch e Audran [30] e modificado por Dos-Santos et al. [31] e

Dias et al. [32]. Para a purificação, foram feitos *pool* do muco coletado dos animais infectado ou não infectado, utilizando-se 100µL de cada animal, totalizando em um pool de 1000µL de muco para ambos os grupos. A partir disso, o pH das amostras foi aferido em 6,0 e adicionou-se, gota a gota, o ácido caprílico (Merck, Darmstadt) na concentração final de 8,7 %, sob agitação, por 30 minutos à temperatura ambiente, com a finalidade de precipitar todas as proteínas e manter as imunoglobulinas na fase líquida. Em seguida, o material foi centrifugado em 14000 rpm por 30 min à 4° C (Centrifuge 5804R, Eppendorf, USA), sendo realizada então, a coleta do sobrenadante (fase líquida) e armazenagem à 20°C.

2.4. Eletroforese em SDS – PAGE e Western blot

A pureza das imunoglobulinas obtidas do tambaqui foi analisada pelo método de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE), de acordo com protocolo utilizado em Laemmli, 1970 [33]. Um gel foi colorido com Coomassie Brilliant Blue (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) e o outro gel foi usado para o *western blot* (Wb). As amostras de muco purificado foram diluídas na proporção 1:1 (v/v) em tampões sem 2-mercaptoetanol (solução A) e com 2-mercaptoetanol (solução B). Com a finalidade de comparar com as amostras purificadas, o muco íntegro do tambaqui também foi diluído no tampão de amostra, em condição não reduzida (solução A) e reduzida (solução B) (Figura 1A) para a realização da corrida de eletroforese sem a purificação pelo ácido caprílico.

Dez microlitros de cada amostra foram aplicados sobre o gel de empilhamento a 5% de acrilamida e a separação das proteínas foi realizada no gel de corrida com concentração de 15% de acrilamida. Miosina (202,5 kDa), β -galactosidase (113,9 kDa), Albumina (72,7 kDa), Ovalbumina (46,7 kDa), Anidrase carbônica (33,8 kDa), Inibidor soja tripsina (26,9 kDa), Lisozima (17,4 kDa) e Aprotinina (5,9 kDa) (Bio Rad Prestained Marker, Standards Broad Range, USA) foram usadas como marcadores de massa molecular.

Para o *western blot*, as proteínas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose 0,45 µm (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) no sistema Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) sobre uma corrente constante de 200 mA por 2h. Após a transferência, a membrana foi imersa em uma solução bloqueadora (PBS contendo leite desnatado 5%, Molico, Nestlé, SP) *overnight*, à 4°C. A membrana foi

incubada com anticorpos de camundongo anti-imunoglobulinas totais séricas de tambaqui (20µL) preparados conforme Sousa [56] em uma diluição de 1:1000 em tampão PBS, por 1h, à temperatura ambiente. A membrana foi lavada 5 vezes com salina (0,9%) e incubada com o conjugado anti-imunoglobulinas de camundongo marcado com peroxidase (20 µL) (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA), em diluição de 1:1000 em tampão PBS, por 1h, à temperatura ambiente. Após cinco lavagens com salina, a coloração foi revelada com DAB (0,5 mgmL⁻¹) (3, 3'-diaminobenzidina) na presença do substrato da peroxidase, a H₂O₂ 30% (1,5 mgmL⁻¹). A reação foi interrompida pela lavagem sucessiva da membrana com água destilada.

2.5. Titulação de imunoglobulinas

A titulação das imunoglobulinas de amostras individuais dos peixes infectados e não infectados foi realizada pelo método Dot-ELISA. Uma placa de ELISA foi bloqueada com uma solução bloqueadora (PBS contendo leite desnatado 5%, Molico, Nestlé, SP). Após descarte da solução, foi acrescentado 100 µL de solução com amostras individuais de muco em diluição 1:100 em tampão PBS. A partir disso, foi realizada a diluição seriada, com diluição inicial de 1:100 a 1:51200. Após isto, em uma membrana de nitrocelulose 0.45 µm (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) foram aplicados 2,0 µL de cada diluição seriada do muco e, após secagem, a membrana foi imersa em solução bloqueadora (PBS contendo leite desnatado 5%, Molico, Nestlé, SP) *overnight*, à 4°C.

Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpos de camundongo anti-imunoglobulinas totais séricas de tambaqui em uma diluição de 1:1000 em tampão PBS, por 1h, à temperatura ambiente. Então, a membrana foi lavada 5 vezes com água salina (0,9%) e incubada com o conjugado anti-imunoglobulinas de camundongo marcado com peroxidase, em diluição de 1:1000 em tampão PBS, por 1h, à temperatura ambiente. Após cinco lavagens, a coloração foi revelada com DAB (0,5 mgmL⁻¹) (3, 3'-diaminobenzidina) na presença do substrato da peroxidase, a H₂O₂ 30% (1,5 µLmL⁻¹). A reação foi interrompida pela lavagem sucessiva da membrana com água destilada.

2.6. Análise parasitológica

Os parasitos acantocéfalos coletados do trato gastrointestinal de tambaquis foram contabilizados e os dados foram utilizados para o cálculo do índice parasitológico de intensidade média [34].

2.7. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o *R Statistical Software* (TEAM, 2013). A titulação de imunoglobulinas dos animais infectados e não infectados foi comparada pelo teste de Mann-Whitney e a diferença foi considerada significativa quando o $p < 0.05$.

3. RESULTADOS

3.1. SDS-PAGE

Na condição íntegra do muco, não foi possível realizar a separação de proteínas, devido às suas características físico-químicas que impedem a migração livre das proteínas pelo gel. A análise da purificação das imunoglobulinas totais presentes no muco intestinal de *Colossoma macropomum* (Figura 1.B) pelo ácido caprílico revela uma série de bandas com massa molecular variando de ~202 kDa a ~20 kDa. Nas amostras purificadas não reduzidas (PIA, PNA), pode-se identificar uma banda de maior massa molecular (~200 kDa) que desaparece após o tratamento com 2-mercaptoetanol.

Observa-se, também, o aumento do número de bandas de menor massa molecular nas amostras purificadas reduzidas entre ~60 kDa a ~40 kDa e ~35 kDa a ~26 kDa, indicando que houve uma dissociação das cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas parcialmente isoladas. Além disso, nas amostras não reduzidas foi encontrada uma banda de ~55 kDa que pode ser outra classe de imunoglobulina, uma vez que também desaparece nas amostras reduzidas.

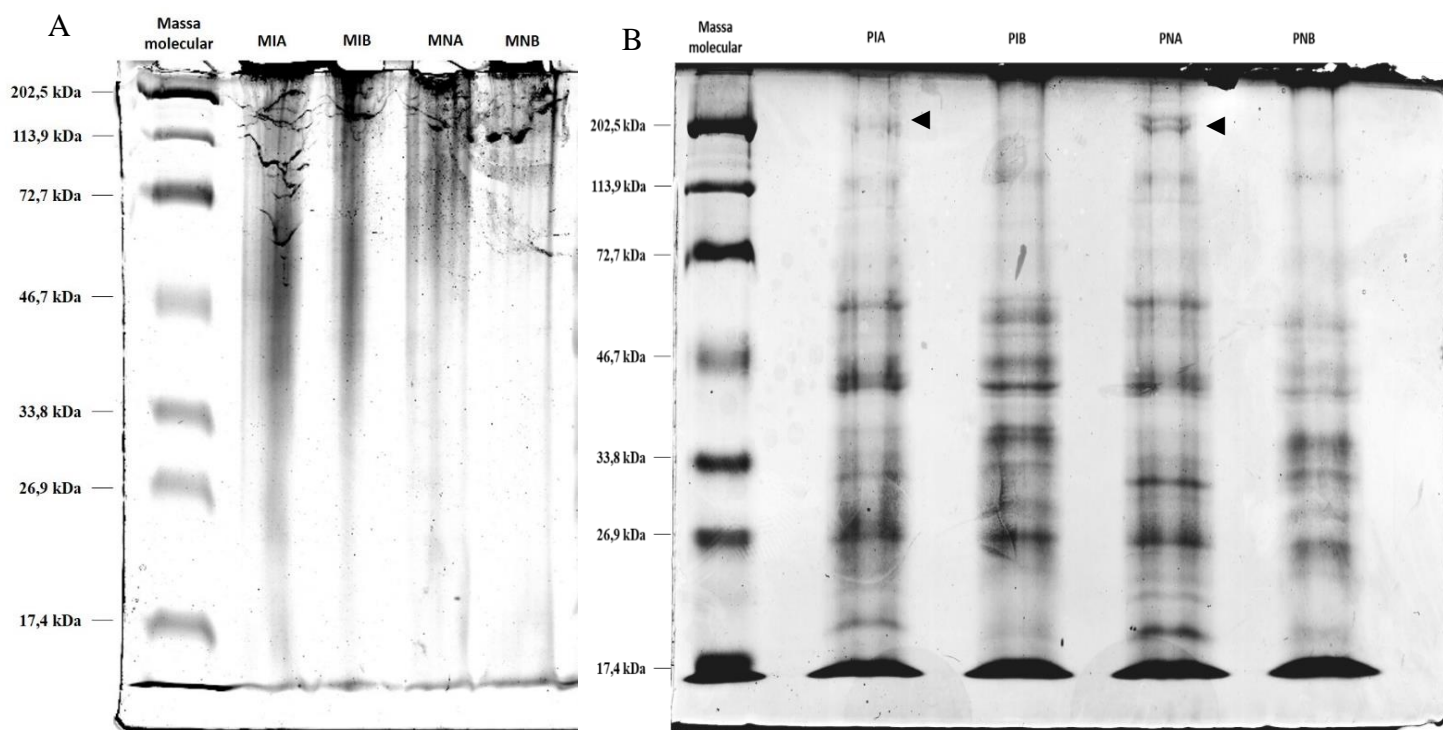


Figura 1. Gel de eletroforese de *Colossoma macropomum*. A) Amostras com muco intestinal íntegro: MIA - amostra dos animais infectados sem redução; MIB - amostra dos animais infectados com redução; MNA - amostra dos animais não infectados sem redução; MNB - amostra dos animais não infectados com redução. B) Amostras com muco purificado por ácido caprílico: PIA - amostra dos animais infectados sem redução; PIB - amostra dos animais infectados com redução; PNA - amostra dos animais não infectados sem redução; PNB - amostra dos animais não infectados com redução. Classe de Ig isolada que sofreu evidente dissociação devido à redução com 2-mercaptoetanol (cabeça de seta).

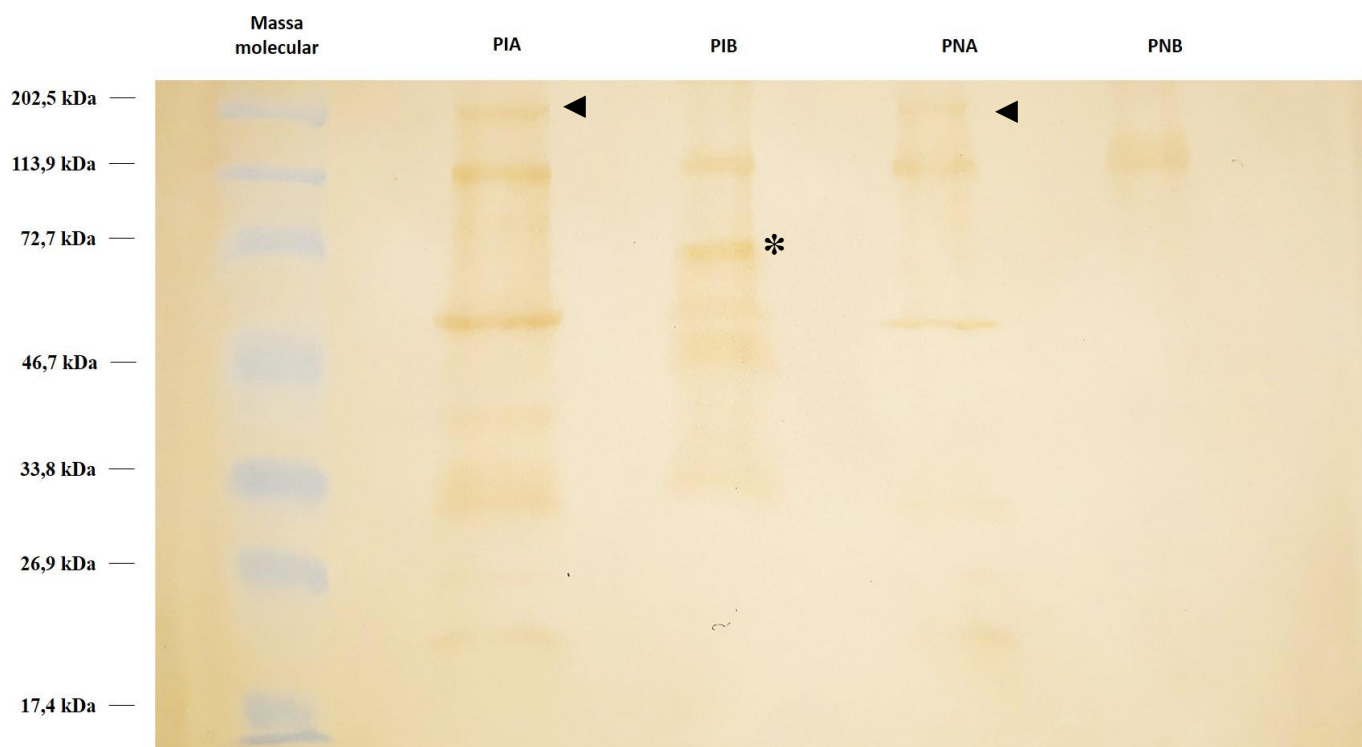


Figura 2. Western blot de muco de *Colossoma macropomum* marcado com anticorpo anti-Ig totais séricas de *C. macropomum*. Amostras com muco purificado por ácido caprílico: PIA - amostra dos animais infectados sem redução; PIB - amostra dos animais infectados com redução; PNA - amostra dos animais não infectados sem redução; PNB - amostra dos animais não infectados com redução. A cabeça de seta mostra a classe de Ig isolada tanto no tambaqui infectado e não infectado sofreu evidente dissociação em cadeia pesada (*) e cadeia leve devido à redução com 2-mercaptoetanol. Anticorpo de camundongo anti-Ig totais séricas de tambaqui mostrou reatividade com as imunoglobulinas do muco de tambaqui.

3.2. Western blot

Ao realizar o *western blot*, foi possível identificar as bandas proteicas que apresentaram reação com os anticorpos anti-Ig totais séricos de *Colossoma macropomum*. Nas amostras não reduzidas dos animais não infectados e infectados, encontram-se três bandas com maior evidência apresentando massa molecular de aproximadamente 200 kDa, 114 kDa e 55 kDa. Nas amostras reduzidas dos animais infectados, identifica-se uma banda com massa molecular de ~70 kDa, equivalente às cadeias pesadas e outra banda com aproximadamente ~30 kDa, equivalente a massa molecular das cadeias leves de imunoglobulinas em teleósteos.

As bandas identificadas como imunoglobulinas apresentaram maior intensidade de reação nas amostras dos animais infectados. Em contraste, nos animais não infectados, a reação foi menos intensa em todas as bandas, principalmente nas bandas de menor massa molecular e não foi possível detectar a dissociação em cadeias pesadas e leves da imunoglobulina isolada nas amostras não reduzidas.

3.3. Titulação de imunoglobulinas do muco intestinal de *C. macropomum*

Os títulos individuais de imunoglobulinas foram comparados entre tambaqui

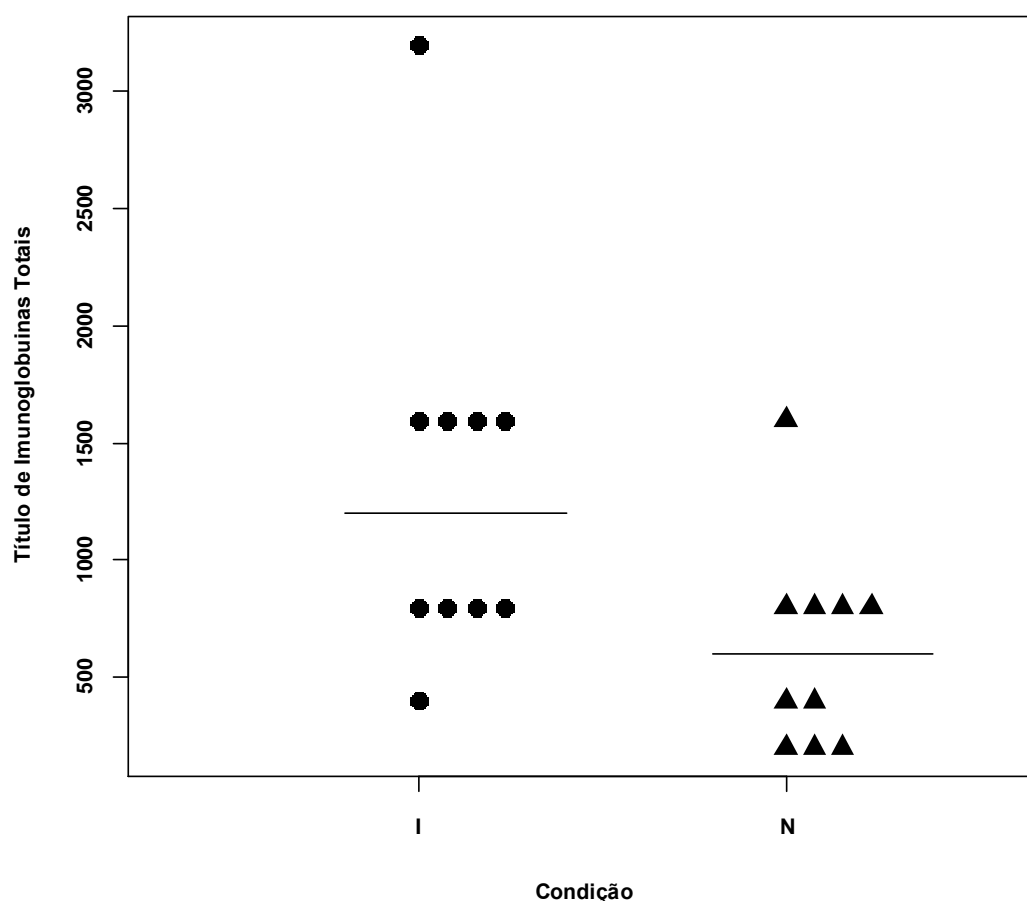


Figura 3. Título de imunoglobulinas totais no muco intestinal de *Colossoma macropomum* não-infectados (N) e infectados (I) por *Neoechinorhynchus buttnerae* (Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

infectado e não infectado por *Neoechinorhynchus buttnerae*. Avaliando os títulos de anticorpos presentes no muco intestinal de tambaqui, os animais infectados apresentaram títulos significativamente maiores do que os animais não infectados ($p < 0,05$). Os animais infectados apresentaram mais frequentemente títulos entre 1:800 e 1:1600, enquanto os animais não infectados apresentaram com maior frequência títulos entre 1:200 e 1:800 (Figura 3). A maior titulação nos animais infectados pelo *N. buttnerae* corrobora com a maior intensidade nas bandas provavelmente equivalentes a imunoglobulinas mostrada pelo *western blot*, indicando o aumento da presença de imunoglobulinas no muco em resposta ao parasito na mucosa intestinal.

3.4 Análise parasitológica

Os animais infectados apresentaram uma baixa intensidade de infecção ($19,6 \pm 26$), sendo encontrado no mínimo 1 parasito por peixe e no máximo 88 parasitos por peixe.

4. Discussão

A purificação parcial das imunoglobulinas presentes no muco intestinal de tambaqui foi realizada pela primeira vez utilizando exclusivamente o ácido caprílico, a fim de propor a simplificação deste processo para o muco. A purificação das imunoglobulinas pelo método do ácido caprílico tem sido feita, principalmente, para a separação de anticorpos plasmáticos ou como uma etapa do processo de isolamento de imunoglobulinas presente no plasma de mamíferos [35,36]. Para as diferentes espécies de teleósteos, a purificação de imunoglobulinas no plasma e no muco é comumente realizada pela cromatografia de afinidade com proteína A ou proteína G [37–39], filtração em gel [11,40] ou por precipitação com sulfato de amônio [41,42].

A escolha do método do ácido caprílico foi feita por este apresentar alta afinidade com as proteínas séricas, levando à sua precipitação e deixando as imunoglobulinas em suspensão, sendo uma metodologia simples que pode ser facilmente replicada. Além disso, a cromatografia por afinidade apresenta um alto grau de pureza, porém possuem algumas limitações para produção em larga escala como alto valor de aquisição das proteínas A e G [43]. A precipitação por sulfato de amônio é um procedimento que demanda grande quantidade de tempo para sua realização [43], além

de não purificar totalmente as imunoglobulinas, apresentando contaminação com outras proteínas plasmáticas [31]. Atualmente, o método do ácido caprílico é recomendado pela OMS para obtenção dos imunobiológicos [44].

O grau de pureza obtido com o ácido caprílico e revelado pelo SDS-PAGE ainda não é o desejável. Nas amostras reduzidas e não reduzidas, observa-se proteínas de baixo peso molecular que podem ser equivalentes a outras classes de imunoglobulinas não identificadas ou contaminantes que não foram precipitadas nas condições de pH e concentração de ácido caprílico estabelecidas. Para a purificação do plasma de mamíferos, já foram observadas que no pH 5 obtém-se maior grau de pureza, enquanto pH abaixo de 4 ou acima de 6, já apresentam aumento de contaminantes [3]. Porém, nos ensaios preliminares deste estudo, observou-se que não houve diferença significativa na purificação das bandas utilizando-se pH 5 e 6. Optou-se por realizar a purificação com o pH 6, obtido naturalmente durante a aferição do pH do muco intestinal.

Quanto à concentração final de ácido caprílico, utilizou-se a mesma realizada por Dias et al. [32] e Costa et al. [29], sendo as únicas referências encontradas para purificação de imunoglobulinas com ácido caprílico para peixes. A concentração de 8,7% adaptada para plasma de teleósteos não resultou no mesmo grau de pureza para o muco, mostrando a necessidade de ajuste na determinação da concentração final a ser utilizada. Assim, a observação da dissociação de cadeias leves e pesadas nas amostras com redução foi dificultada pela sobreposição das bandas com provavelmente outros contaminantes no SDS-PAGE ou cadeias dissociadas de diferentes classes de imunoglobulinas. Em contrapartida, o desaparecimento da banda de massa molecular ~200 kDa, com o aumento do número de bandas de menor massa molecular, indica que foi possível isolar algumas classes de imunoglobulinas e essas imunoglobulinas isoladas tiveram suas cadeias pesadas e leves dissociadas (Figura 1B).

Nos estudos realizando a purificação das imunoglobulinas séricas de juvenis e adultos de *C. macropomum* utilizando o ácido caprílico foi obtido um grau satisfatório de pureza, sendo possível identificar bandas de pesos moleculares similares às imunoglobulinas de outros teleósteos [29,45]. Imunoglobulinas isoladas em outras espécies de teleósteos também apresentaram resultados semelhantes. Na purificação de IgM sérica em condição não redutora da enguia japonesa (*Anguilla japonica*) foram encontrados pesos moleculares de 790 kDa, 400 kDa e 195 kDa, aos quais os autores atribuíram às formas tetraméricas, diméricas e monoméricas, respectivamente [46]. A

forma monomérica da IgM sérica também apresentou peso molecular de ~200 kDa em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), salmão do Atlântico (*Salmo salar*), tilápia moçambicana (*Oreochromis mossambicus*), perca-gigante (*Lates calcarifer*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e robalo (*Morone saxatilis*) [38]. Esta forma monomérica de IgM foi a classe de imunoglobulina isolada pelo ácido caprílico e identificada no SDS-PAGE neste trabalho.

O *western blot* revelou com mais evidência na amostra reduzida dos animais infectados uma banda de ~70 kDa, que pode se inferir ser a cadeia pesada da imunoglobulina isolada (Figura 2). Valores equivalentes foram encontrados na purificação da IgM no soro e muco da pele de ‘catfish’ (*Ictalurus punctatus*) sob redução, mostrando o peso molecular da cadeia pesada de, aproximadamente, 80 kDa [47]. De forma semelhante em outros teleósteos, na dissociação da IgM tanto no soro quanto no muco, foram observados pesos moleculares de ~60 a 75 kDa (cadeia pesada) e ~20 a 30 kDa (cadeia leve) [40,48–50].

No *western blot*, os anticorpos de camundongo anti-imunoglobulinas totais séricas reagiram com as imunoglobulinas isoladas do muco intestinal do tambaqui. Isso indica a presença de classe (s) de imunoglobulina (s) similares no soro e no muco dos animais. Tanto nos animais não infectados quanto infectados é possível observar essa reação, indicando que estas imunoglobulinas se encontram em níveis basais na mucosa intestinal do tambaqui. A similaridade entre imunoglobulinas séricas e presentes no muco foi encontrada também em *Archosargus probatocephalus*, sendo as imunoglobulinas do muco equivalente as imunoglobulinas séricas de alta massa molecular (HMW) [51].

Bilal et al. [52] também detectaram reatividade cruzada entre a IgM presente no muco intestinal com a IgM sérica de ‘ballan wrasse’ (*Labrus bergylta*) utilizando o anticorpo de coelho produzido contra IgM sérica dessa espécie de peixe e notaram que ambas IgM (sérica e da mucosa) apresentaram, quando dissociadas, massas moleculares semelhantes para as cadeias pesadas e leves. Além disso, a reação observada no *western blot* com o muco dos animais infectados pode ter sido intensificada pela contribuição de exsudatos plasmáticos devido a reação inflamatória local em resposta ao parasita.

A intensidade média parasitária do tambaqui neste estudo ($19,6 \pm 26$) foi baixa comparada ao reportado por Jerônimo et al. [25], Lourenço et al. [53], Pereira & Morey [26] e Aguiar et al. [23]. Nestes trabalhos, a intensidade média de infecção no tambaqui

por *N. buttnerae* foi em torno de 243 parasitos por animal e as alterações descritas foram principalmente relacionadas a danos mecânicos causados pela fixação da probóscide na parede intestinal. Os principais danos relatados na camada da mucosa foram descamação e achatamento das células epiteliais, hiperplasia e hipertrofia das células caliciformes (células produtoras de muco), sendo observado o desaparecimento das vilosidades e necroses focais apenas nas regiões em que o parasito estava com a probóscide fixa [23].

A presença de um parasito e o dano causado na mucosa intestinal induz a liberação de PAMP (padrões moleculares associados a patógenos) e DAMP (padrões moleculares associados ao dano), que resulta em resposta inflamatória no local da infecção [54]. Com a resposta inflamatória, também há o estímulo à apresentação de antígenos para os linfócitos T auxiliares e linfócitos B, processo que resulta na produção de anticorpos específicos ao parasito [55]. Neste trabalho, a maior intensidade das imunoglobulinas no *western blot* dos tambaquis infectados foi corroborada pela maior titulação dos anticorpos no Dot-ELISA (Figura 3, $p < 0,05$) nesse grupo, demonstrando que a infecção por *N. buttnerae* resultou no aumento da quantidade de imunoglobulinas na mucosa intestinal de tambaqui.

Neste estudo, não foi verificado se o aumento da expressão das imunoglobulinas na mucosa intestinal conferiu alguma resistência ao tambaqui à reinfecção pelo *N. buttnerae*. Porém, demonstrou-se que o *C. macropomum* é capaz de elaborar uma resposta específica além da resposta inflamatória já descrita a parasitos intestinais, ao acantocéfalo *N. buttnerae*. Foi possível observar que o muco que reveste na mucosa intestinal do tambaqui também agrega as imunoglobulinas produzidas e secretadas, reforçando a importância desse fluido na resposta imune inata e adaptativa às infecções por parasitos.

6. Referências

- [1] A.R. Miranda-Cruz, R. Sánchez-Artigas, O. Otero-Alfaro, W. Góngora-Amores, D. Cobos-Valdes, Y. Goya-Batista, J. Balboa-González, O. Pérez-Martín, Using the caprylic acid in obtaining the horse immunoglobulin anti tetanus toxin, *Vaccimonitor*. 23 (2014) 63–72.
- [2] R. Sommer, A. Tscheliessnig, P. Satzer, H. Schulz, B. Helk, A. Jungbauer, Capture and intermediate purification of recombinant antibodies with combined precipitation methods, *Biochem. Eng. J.* 93 (2015) 200–211. doi:10.1016/j.bej.2014.10.008.
- [3] V. Morais, H. Massaldi, A model mechanism for protein precipitation by caprylic acid: Application to plasma purification, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 59 (2012) 50–54. doi:10.1002/bab.68.
- [4] S. Mashoof, M. Criscitiello, *Fish Immunoglobulins, Biology (Basel)*. 5 (2016) 45. doi:10.3390/biology5040045.
- [5] L. Pilström, E. Bengtén, Immunoglobulin in fish - Genes, expression and structure, *Fish Shellfish Immunol.* 6 (1996) 243–262. doi:10.1006/fsim.1996.0026.
- [6] I. Salinas, Y.-A. Zhang, J.O. Sunyer, Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish, *Dev. Comp. Immunol.* 35 (2011) 1346–1365.
- [7] R.T. Acton, P.F. Weinheimer, H.K. Dupree, T.R. Russell, M. Wolcott, E.E. Evans, R.E. Schrohenloher, J.C. Bennett, Isolation and characterization of the immune macroglobulin from the paddlefish, *Polyodon spathula*, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 6760–6769.
- [8] N. Danilova, J. Bussmann, K. Jekosch, L.A. Steiner, The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z, *Nat. Immunol.* 6 (2005) 295.
- [9] J.D. Hansen, E.D. Landis, R.B. Phillips, Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (2005) 6919–6924.
- [10] J. Velázquez, J. Acosta, J.M. Lugo, E. Reyes, F. Herrera, O. González, A. Morales, Y. Carpio, M.P. Estrada, Discovery of immunoglobulin T in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): A potential molecular marker to understand mucosal immunity in this species, *Dev. Comp. Immunol.* 88 (2018) 124–136. doi:10.1016/j.dci.2018.07.013.

- [11] Y.-A. Zhang, I. Salinas, J. Li, D. Parra, S. Bjork, Z. Xu, S.E. LaPatra, J. Bartholomew, J.O. Sunyer, IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity, *Nat. Immunol.* 11 (2010) 827.
- [12] E.-S. Edholm, E. Bengtén, J.L. Stafford, M. Sahoo, E.B. Taylor, N.W. Miller, M. Wilson, Identification of two IgD⁺ B cell populations in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, *J. Immunol.* (2010) 1000631.
- [13] E. Bengtén, M. Wilson, Antibody repertoires in fish, in: *Pathog. Interact. Antigen. Var. v. Somat. Adapt.*, Springer, 2015: pp. 193–234.
- [14] I. Salinas, The Mucosal Immune System of Teleost Fish, *Biology (Basel)*. 4 (2015) 525–539. doi:10.3390/biology4030525.
- [15] G.D. Gómez, J.L. Balcázar, A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish: Table 1, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52 (2008) 145–154. doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00343.x.
- [16] B. Magnadóttir, Innate immunity of fish (overview), *Fish Shellfish Immunol.* 20 (2006) 137–151. doi:10.1016/j.fsi.2004.09.006.
- [17] B.S. Dezfuli, F. Pironi, M. Campisi, A.P. Shinn, L. Giari, The response of intestinal mucous cells to the presence of enteric helminths: their distribution, histochemistry and fine structure, *J. Fish Dis.* 33 (2010) 481–488.
- [18] Y.-Y. Yu, W. Kong, Y.-X. Yin, F. Dong, Z.-Y. Huang, G.-M. Yin, S. Dong, I. Salinas, Y.-A. Zhang, Z. Xu, Mucosal immunoglobulins protect the olfactory organ of teleost fish against parasitic infection, *PLoS Pathog.* 14 (2018) e1007251.
- [19] D. Zilberg, P.H. Klesius, Quantification of immunoglobulin in the serum and mucus of channel catfish at different ages and following infection with *Edwardsiella ictaluri*, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 58 (1997) 171–180.
- [20] I.R. Bricknell, J.A. King, T.J. Bowden, A.E. Ellis, Duration of protective antibodies, and the correlation with protection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), following vaccination with an *Aeromonas salmonicida* vaccine containing iron-regulated outer membrane proteins and secretory polysaccharide, *Fish Shellfish Immunol.* 9 (1999) 139–151. doi:10.1006/fsim.1998.0183.
- [21] A. Picard-Sánchez, I. Estensoro, R. del Pozo, M.C. Piazzon, O. Palenzuela, A. Sitjà-Bobadilla, Acquired protective immune response in a fish-myxozoan model

- encompasses specific antibodies and inflammation resolution, *Fish Shellfish Immunol.* 90 (2019) 349–362. doi:10.1016/j.fsi.2019.04.300.
- [22] IBGE, Produção da Pecuária Municipal, Rio de Janeiro, 2017. <https://www.ibge.gov.br/%0Aestatisticas-novoportal/%0Aeconomicas/agricultura-epecuaria/9107-producao-dapecuaria-municipal.html>.
- [23] L.S. Aguiar, M.I.B. de Oliveira, L.V. de Matos, A.L.S. Gomes, J.I. da Costa, G.S. da Silva, Distribution of the acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae* and semiquantitative analysis of histopathological damage in the intestine of tambaqui (*Colossoma macropomum*), *Parasitol. Res.* 117 (2018) 1689–1698. doi:10.1007/s00436-018-5840-8.
- [24] L.V. de Matos, M.I.B. de Oliveira, A.L.S. Gomes, G.S. da Silva, Morphological and histochemical changes associated with massive infection by *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) in the farmed freshwater fish *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 from the Amazon State, Brazil, *Parasitol. Res.* 116 (2017) 1029–1037.
- [25] G.T. Jerônimo, S.B. de Pádua, M.A. de A. Belo, E.C. Chagas, S.R. Taboga, P.O. Maciel, M.L. Martins, *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala) infection in farmed *Colossoma macropomum*: A pathological approach, *Aquaculture.* 469 (2017) 124–127. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.11.027.
- [26] J.N. Pereira, G.A.M. Morey, First record of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Eoacanthocephala, Neoechinorhynchidae) on *Colossoma macropomum* (Characidae) in a fish farm in Roraima, Brazil, *Acta Amaz.* 48 (2018) 42–45. doi:10.1590/1809-4392201702411.
- [27] J. Biller-Takahashi, H. Montassier, L. Takahashi, E. Urbinati, Proposed method for agglutinating antibody titer analysis and its use as indicator of acquired immunity in pacu, *Piaractus mesopotamicus*, *Brazilian J. Biol.* 74 (2014) 238–242. doi:10.1590/1519-6984.21312.
- [28] T.H.V. Farias, K.R. Silva, V.C. Mariguela, H.J. Montassier, F. Pilarski. Development of an indirect ELISA assay to evaluation of the adaptive immune response of pacu (*Piaractus mesopotamicus*), *An. Acad. Bras. Cienc.* 90 (2018) 3327–3335. doi:10.1590/0001-3765201820170438.

- [29] O.T.F. da Costa, L.C. Dias, C.S.Y. Malmann, C.A. de Lima Ferreira, I.B. do Carmo, A.G. Wischneski, R.L. de Sousa, B.A.S. Cavero, J.L.V. Lameiras, M.C. Dos-Santos, The effects of stocking density on the hematology, plasma protein profile and immunoglobulin production of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) farmed in Brazil, *Aquaculture*. 499 (2019) 260–268.
- [30] M. Steinbuch, R. Audran, The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid, *Arch. Biochem. Biophys.* 134 (1969) 279–284.
- [31] M.C. Dos Santos, M.R.D. Lima, G.C. Furtado, G. Colletto, T.L. Kipnis, W.D. Da Silva, Purification of F (ab')₂ anti-snake venom by caprylic acid: a fast method for obtaining IgG fragments with high neutralization activity, purity and yield, *Toxicon*. 27 (1989) 297–303.
- [32] C.A.C. de V. Dias, J.D. de Góes Filho, R.R.C. Oliveira, R.L. de Sousa, W.L.P. Duncan, E. Ono, L.A. Mariúba, J.L.V. Lameiras, M.C. Dos-Santos, Caracterização parcial das imunoglobulinas de *Plesiotrygon iwamae* (Chondrichtyes-Potamotrygonidae) e de *Colossoma macropomum* (Osteichthyes-Characidae) isoladas com ácido caprílico, *Sci. Amaz.* 4 (2015) 1–9.
- [33] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*. 227 (1970) 680.
- [34] A.O. Bush, K.D. Lafferty, J.M. Lotz, A.W. Shostak, Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited, *J. Parasitol.* (1997) 575–583.
- [35] S. Eursakun, P. Simsiriwong, K. Ratanabanangkoon, Studies on the fractionation of equine antivenom IgG by combinations of ammonium sulfate and caprylic acid, *Toxicon*. 60 (2012) 1022–1029. doi:10.1016/J.TOXICON.2012.07.005.
- [36] M. Vargas, Á. Segura, Y.-W. Wu, M. Herrera, M.-L. Chou, M. Villalta, G. León, T. Burnouf, Human plasma-derived immunoglobulin G fractionated by an aqueous two-phase system, caprylic acid precipitation, and membrane chromatography has a high purity level and is free of detectable *in vitro* thrombogenic activity, *Vox Sang.* 108 (2015) 169–177. doi:10.1111/vox.12209.
- [37] R.. Morrison, B.. Nowak, Affinity purification and partial characterisation of systemic immunoglobulin of the snapper (*Pagrus auratus*), *Aquaculture*. 201 (2001) 1–17. doi:10.1016/S0044-8486(01)00566-X.

- [38] E. Bromage, Use of staphylococcal protein A in the analysis of teleost immunoglobulin structural diversity, *Dev. Comp. Immunol.* 28 (2004) 803–814. doi:10.1016/j.dci.2003.12.001.
- [39] N. Sood, G. Rathore, T.R. Swaminathan, R. Abidi, B.N. Mishra, W.S. Lakra, Isolation and characterization of serum immunoglobulin of *Cyprinus carpio*, *Indian J. Anim. Sci.* 77 (2007) 642–645.
- [40] S. Bilal, K.K. Lie, O.A. Karlsen, I. Hordvik, Characterization of IgM in Norwegian cleaner fish (lumpfish and wrasses), *Fish Shellfish Immunol.* 59 (2016) 9–17. doi:10.1016/j.fsi.2016.09.063.
- [41] R.A. Bagchi, P.H. Parikh, N. Roy, R. Pehlathia, J. Mukherjee, A.K. Bagchi, Purification and characterization of Indian catfish (*Clarias batrachus*) IgM, *World J. Zool.* 5 (2010) 205–209.
- [42] X. Sheng, G. Xu, X. Tang, W. Zhan, Monoclonal antibodies recognizing mucus immunoglobulin and surface immunoglobulin-positive cells of flounder (*Paralichthys olivaceus*), *Vet. Immunol. Immunopathol.* 145 (2012) 143–150. doi:10.1016/J.VETIMM.2011.10.022.
- [43] J.B. Fishman, E.A. Berg, Antibody Purification and Storage, *Cold Spring Harb. Protoc.* 2019 (2019) 331–345. doi:10.1101/pdb.top099101.
- [44] W.H. Organization, WHO Expert Committee on Biological Standardization, sixty-seventh report, Geneva, 2017.
- [45] P. Lloyd-Evans, Purification and characterization of high molecular weight (HMW) and low molecular weight (LMW) immunoglobulins from the serum of the dogfish, *Scyliorhinus canicula*, and the identification of antibody forming tissues, *Int. J. Biochem.* 25 (1993) 1823–1833. doi:10.1016/0020-711X(88)90313-8.
- [46] D. Uchida, H. Hirose, P.. Chang, F. Aranishi, E. Hirayabu, N. Mano, T. Mitsuya, S.. Prayitno, M. Natori, Characterization of Japanese eel immunoglobulin M and its level in serum, *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 127 (2000) 525–532. doi:10.1016/S0305-0491(00)00290-X.
- [47] M.D. Lange, C.D. Webster, The effect of temperature on the mucosal IgM antibody response to DNP-KLH in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), *Fish Shellfish Immunol.* 70 (2017) 493–497. doi:10.1016/j.fsi.2017.09.026.

- [48] B. Magnadóttir, Comparison of immunoglobulin (IgM) from four fish species, Icelandic Agric. Sci. 12 (1998) 47–59.
- [49] F. Hatten, Å. Fredriksen, I. Hordvik, C. Endresen, Presence of IgM in cutaneous mucus, but not in gut mucus of Atlantic salmon, *Salmo salar*. Serum IgM is rapidly degraded when added to gut mucus, Fish Shellfish Immunol. 11 (2001) 257–268.
- [50] S.-H. Lim, H.-T. Ho, S.M.S. Khader, J. Kwang, First report on the isolation of immunoglobulin M of guppy, *Poecilia reticulata*, for the production of polyclonal antibodies, Aquaculture. 295 (2009) 134–137. doi:10.1016/J.AQUACULTURE.2009.06.040.
- [51] C.J. Lobb, L.W. Clem, Phylogeny of Immunoglobulin Structure and Function. XI. Secretory Immunoglobulins in the Cutaneous Mucus of the Sheepshead, *Archosargus probatocephalus*, Dev. Comp. Immunol. 5 (1981) 587–596. doi:10.1016/S0145-305X(81)80033-X.
- [52] S. Bilal, K.K. Lie, A.S. Dalum, O.A. Karlsen, I. Hordvik, Analysis of immunoglobulin and T cell receptor gene expression in ballan wrasse (*Labrus bergylta*) revealed an extraordinarily high IgM expression in the gut, Fish Shellfish Immunol. (2019). doi:10.1016/j.fsi.2019.02.007.
- [53] F.S. Lourenço, G.A.M. Morey, J.N. Pereira, J.C.O. Malta, Ocorrência de *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *buttnerae* GOLVAN, 1956 (ACANTOCEPHALA: NEOCHINORHYNCHIDAE) em *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) (CHARACIFORMES: SERRASALMIDAE) provenientes de uma piscicultura da Amazônia brasileira, Folia Amaz. 26 (2017) 1–8. doi:https://doi.org/10.24841/fa.v26i1.414.
- [54] C.J. Secombes, T. Wang, The innate and adaptive immune system of fish, in: B. Austin (Ed.), Infect. Dis. Aquac. Prev. Control, 1st ed., 2012: pp. 3–68. doi:10.1016/B978-0-85709-016-4.50001-5.
- [55] J.H.W.M. Rombout, G. Yang, V. Kiron, Adaptive immune responses at mucosal surfaces of teleost fish, Fish Shellfish Immunol. 40 (2014) 634–643.
- [56] R.L. de Sousa, Desenvolvimento de uma *startup* e de ferramentas para diagnóstico de doenças endêmicas de tambaqui (*Colossoma macropomum*), Universidade Federal do Amazonas, 2019.

Capítulo III

Perfil da resposta imune humoral local e sistêmica em *Colossoma macropomum* infectado por *Neoechinorhynchus buttnerae*

Artigo a ser submetido à revista: Fish &
Shellfish Immunology ISSN (eletrônico):
1050-4648. Frequência: mensal.

Profile of local and systemic humoral immune response in *Colossoma macropomum* infected by acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae*

Perfil da resposta imune humoral local e sistêmica em *Colossoma macropomum* infectado por *Neoechinorhynchus buttnerae*

¹Damy Caroline de Melo Souza

²Maria Cristina dos Santos

²Rafael Luckwu de Sousa

³Edsandra Campos Chagas

¹ Programa de Pós-Graduação de Ciências Pesqueiras nos Trópicos, Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

² Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

³ Embrapa Amazônia Ocidental, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Resumo: Os estudos sobre a resposta imune dos peixes a infecções têm estado em enfoque devido ao crescente registro de doenças na aquicultura. Em infecções por acantocéfalos são descritos, principalmente, os danos teciduais e a resposta imune celular associada ao local da infecção, havendo poucas informações quanto à resposta humoral nessas infecções. O presente estudo visa contribuir com o conhecimento sobre o sistema imune de *Colossoma macropomum*, uma das principais espécies cultivadas nas pisciculturas brasileiras, com foco sobre a resposta humoral à infecção pelo *Neoechinorhynchus buttnerae*. Para isto, o soro e o muco intestinal de tambaquis infectados e não infectados foram coletados e avaliados os níveis de alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, proteínas totais e imunoglobulinas totais em cada fluido. A imunohistoquímica do intestino de tambaqui infectados e não infectados foi realizada a fim de confirmar a presença das imunoglobulinas na mucosa intestinal e a interação dessas moléculas com o acantocéfalo. As principais alterações observadas foram o aumento dos títulos de imunoglobulinas totais e fosfatase alcalina no soro, assim como dos níveis de proteínas totais no soro e no muco, e a diminuição dos títulos de imunoglobulinas e fosfatase alcalina no muco intestinal dos animais infectados. Foi observada a presença de imunoglobulinas em células presentes na lâmina própria de animais

não infectados e de imunoglobulinas no muco intestinal e em contato direto com a superfície do parasito. A infecção pelo *N. buttnerae* resultou na variação de fatores humorais característicos da resposta imune inata e adaptativa no soro e no muco intestinal do *C. macropomum*, indicando que esta infecção apresenta efeitos locais e sistêmicos que pode comprometer a saúde do hospedeiro.

Palavra-chave: infecção, inata, adaptativa, tambaqui, piscicultura

Abstract: Studies on fish immune response to infections have been in focus due to the growing record of diseases in aquaculture. In acanthocephalan infections, tissue damage and cellular immune response associated with the site of infection are described, but there is little information about fish humoral response in these infections. This study aims to contribute to the knowledge about the *Colossoma macropomum* immune system, one of the main species cultivated in Brazilian fish farms, focusing on the humoral response to *Neoechinorhynchus buttnerae* infection. For this, the serum and intestinal mucus of infected and uninfected tambaqui were collected and the levels of alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, total proteins and total immunoglobulins in each fluid were evaluated. Intestinal immunohistochemistry of infected and uninfected tambaqui was performed to confirm the presence of immunoglobulins in the intestinal mucosa and the interaction of these molecules with *N. buttnerae*. The main alterations observed were the increase in total immunoglobulin and alkaline phosphatase titers in serum, as well as the serum and mucus total protein levels, and the decrease in immunoglobulin and alkaline phosphatase titers in the intestinal mucus of infected animals. It was observed the presence of immunoglobulins in cells present in the lamina propria of uninfected fish and immunoglobulins in intestinal mucus and in direct contact with the parasite surface in infected fish. *N. buttnerae* infection resulted in the variation of humoral factors of the innate and adaptive immune response in *C. macropomum* serum and intestinal mucus, indicating that this infection has local and systemic effects that may compromise host health.

Keywords: infection, innate, adaptive, tambaqui, fish farm

1. Introdução

O sistema imune dos peixes teleósteos apresenta células e proteínas solúveis que são pertencentes às respostas imunes inata e adaptativa. Os componentes da resposta imune inata formam primeira linha de defesa em uma primeira infecção por patógenos ou substâncias imunogênicas, ativam e direcionam a resposta imune adaptativa, que possibilita uma imunidade mais duradoura por meio da formação de células de memória contra o agente indutor [1].

O sistema imune inato é composto por barreiras físicas, químicas e microbiológicas. As barreiras físicas incluem as escamas, a epiderme e o muco produzido que formam uma matriz, a fim de impedir a entrada de agentes patogênicos [2]. O muco que reveste o epitélio das mucosas dos peixes apresenta diversas moléculas agregadas tais como lisozimas, lectinas, proteínas do Sistema Complemento, transferinas e imunoglobulinas, caracterizando a barreira química [3]. O muco também oferece um microambiente que permite a agregação e sobrevivência de microrganismos comensais, não-patogênicos, nas superfícies das mucosas. A presença desses microrganismos é importante na defesa contra patógenos oportunistas do ambiente e também na manutenção da saúde do hospedeiro [4].

De forma semelhante ao muco, o plasma dos peixes é rico em substâncias antimicrobianas tais como lectinas, moléculas do sistema complemento e outras proteínas solúveis como imunoglobulinas que atuam de forma sistêmica na resistência a infecções [5]. A presença dessas moléculas no plasma é especialmente importante no processo inflamatório no qual exsudatos plasmáticos contendo estes componentes séricos são liberados no local da infecção, atuando sinergicamente com a resposta imune local.

O sistema imune adaptativo apresenta três componentes principais: linfócitos T, linfócitos B e imunoglobulinas. Os linfócitos T são responsáveis pelo reconhecimento de antígenos, apresentados por uma célula apresentadora de antígenos (APC) e auxiliam na produção e secreção de anticorpos específicos (imunoglobulinas) pelos linfócitos B nos fluidos corporais do peixe, caracterizando a resposta humoral [6]. As principais funções das imunoglobulinas incluem ativação do Sistema Complemento, neutralização de toxinas e reconhecimento e opsonização de patógenos, a fim de promover a fagocitose [7].

Como resultado de uma infecção por patógenos como helmintos, tanto componentes da imunidade inata quanto adaptativa são modulados devido à cascata do processo inflamatório e a subsequente apresentação de antígenos aos linfócitos B, resultando na produção de

anticorpos com expressão local e sistêmica [4,8,9]. Além disso, indicadores de danos teciduais e estresse fisiológico como os níveis de alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, peroxidases, glicose e proteínas totais também refletem alterações fisiológicas decorrentes da infecção e da resposta imune associada, sendo frequentemente usados para avaliar o estado de saúde dos peixes [10,11].

Estudos avaliando a resposta imune humoral dos peixes a infecções por patógenos têm recebido enfoque nos últimos anos, principalmente devido aos prejuízos econômicos ocasionados por doenças na aquicultura [12]. Apesar dos recentes avanços no conhecimento do sistema imune dos peixes, essa resposta pode variar entre espécies e entre indivíduos devido a fatores intrínsecos como idade, sexo e variabilidade genética [13]. Portanto, a compreensão do sistema imune da espécie em interesse é de extrema importância para o desenvolvimento de diagnósticos, tratamentos e vacinas adequados à capacidade de resposta imune da espécie em suas diferentes fases do ciclo produtivo.

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma espécie Amazônica cultivada nas pisciculturas brasileiras, sendo a segunda espécie mais cultivada no país [14]. Em diversos estados, tem se reportado altas taxas de infecção pelo acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae*, uma espécie específica do tambaqui e seus híbridos, e que na atualidade tem causado prejuízos às pisciculturas [15]. As infecções por acantocéfalos podem causar alterações fisiológicas e danos intestinais dependendo, principalmente, da intensidade da infecção e profundidade de inserção do parasito na parede intestinal [8]. No *C. macropomum* infectado pelo acantocéfalo *N. buttnerae* já foram descritas diversas alterações no intestino devido aos danos mecânicos causados pelo corpo do parasito e o aprofundamento da probóscide na parede intestinal [16–18]. Sinais de anemia hipocrômica também já foram relatados em tambaquis infectados por este parasito [19].

Por outro lado, os estudos avaliando alterações na resposta humoral intestinal e sistêmica em *C. macropomum* infectados por parasitos intestinais como acantocéfalos são inexistentes. O conhecimento sobre esta resposta é de primordial importância para o desenvolvimento adequado de medidas profiláticas e tratamentos efetivos contra a infecção por acantocéfalos e outros patógenos recorrentes no cultivo de tambaqui. Portanto, neste estudo avaliou-se a expressão de fatores humorais em duas classes de peso de tambaqui não infectado e infectado por *N. buttnerae*, considerando as alterações locais e sistêmicas decorrentes da infecção.

2. Material e métodos

2.1. Animais experimentais

Tambaquis, *Colossoma macropomum*, infectados por *Neoechinorhynchus buttnerae* (n=20) foram adquiridos em fazenda comercial e transportados para o setor de piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM. Os peixes coletados foram separados em duas classes de peso: classe 1 ($140,08 \pm 35,7$ g) e classe 2 ($401,66 \pm 33,38$ g) e aclimatados em tanques de 1000L com aeração constante e aquecimento, pelo período de duas semanas, sendo alimentados com ração comercial extrusada (32% PB) duas vezes ao dia. Os parâmetros de qualidade de água como temperatura ($28,6 \pm 0,35$ °C), oxigênio ($5,44 \pm 0,19$ mg L⁻¹) e pH ($5,7 \pm 0,04$) foram monitorados com uso de oxímetro (YSI Pro20 oxygen meter, YSI Inc., USA) e pHmetro digital (YSI F-1100 digital pH meter, YSI Inc., USA). A alcalinidade ($4,93 \pm 1,89$ mg L⁻¹) foi determinada por titulação (ácido sulfúrico 0,02N) e amônia ($0,7 \pm 0,16$ mg L⁻¹) foi analisada pelo método de endofenol, conforme Koroleff [20].

Tambaquis não infectados por *N. buttnerae* (n=20) foram coletados no setor de piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM e separados em classes de peso: classe 1 ($151,01 \pm 31,67$ g) e classe 2 ($467,7 \pm 66,2$ g). Todos os tambaquis foram transferidos para tanques de 1000 L nas mesmas condições de aclimação descrita anteriormente. Os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho estão de acordo com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2018) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Pesca e Aquicultura e está registrado com o nº 08/2018.

2.2. Obtenção do soro

Após a aclimação, 10 animais em cada classe de peso (infectados e não-infectados) foram anestesiados com benzocaína (100 mg L⁻¹) em banho de imersão, realizando-se a coleta de sangue por punção da veia caudal. O sangue coletado foi deixado em temperatura ambiente e, após 1h, foi centrifugado por 5 min realizando-se a coleta do soro e armazenagem à - 80°C até o momento de uso. Após a coleta de sangue, os animais foram eutanasiados, primeiramente induzindo a anestesia profunda com benzocaína (250 mg L⁻¹), seguida de perfuração craniana (CONCEA, 2018).

2.3. Coleta do muco intestinal

O intestino dos peixes foi coletado e aberto longitudinalmente, sendo colocado em placas de Petri com solução salina (0,9%) para verificação da presença de *Neoechinorhynchus buttnerae*. O muco foi obtido por raspagem da mucosa intestinal, após a lavagem do intestino em água salina (0,9%), para a remoção das impurezas. Imediatamente após a coleta, o muco foi colocado em freezer – 20°C e depois transferido para freezer -80°C, de acordo com as condições de estocagem sugeridas por Cordero et al. [21]. O preparo do muco para as análises foi realizado conforme Sanchooli et al. [22]. Uma alíquota do muco coletado (200µL) foi colocado em tubo eppendorf contendo 1800µL de 50mM NaCl, realizando-se a centrifugação a 1500 rpm por 10 min à 4°C e o sobrenadante obtido foi armazenado em – 80°C até o momento de uso.

2.4. Quantificação das proteínas totais

A concentração de proteínas totais (PTT) presentes no soro e no muco intestinal foi determinada pelo método de Lowry et al. [23], com solução de albumina sérica bovina (BSA) utilizada como solução padrão.

2.5. Análises enzimáticas

A atividade da fosfatase alcalina (ALP) foi determinada no soro e no muco intestinal pelo uso de kit colorimétrico (LabTest®, Minas Gerais, Brasil) e a absorbância foi lida a 590 nm em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific, USA). A atividade da alanina aminotransferase (ALT) no soro e no muco intestinal foi determinada por kit em modo cinético (LabTest®, Minas Gerais, Brasil) e absorbância foi lida a 340 nm em espectrofotômetro.

2.6. Titulação das imunoglobulinas totais no soro e no muco

A titulação das imunoglobulinas foi realizada pelo método Dot-ELISA, utilizando 6 animais infectados e 6 animais não infectados em cada classe de peso. Uma placa de ELISA foi bloqueada com tampão fosfato salino (PBS), contendo leite desnatado 5% (Molico-Nestlé-SP). Após descarte da solução, foi acrescentado 100 µL de solução com amostras individuais

de soro e muco em diluição 1:100 em tampão PBS. A partir disso, foi realizada a diluição seriada, com diluição inicial de 1:100 a 1:204800. Após isto, em uma membrana de nitrocelulose 0.45 μm (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) foram aplicados dois μL de cada diluição seriada e, após secagem, a membrana foi imersa em solução bloqueadora (PBS contendo leite desnatado 5%) *overnight*, à 4°C.

A membrana foi incubada com anticorpos de camundongo anti-imunoglobulinas totais séricas de tambaqui preparados conforme Sousa [24] em uma diluição de 1:1000 em tampão PBS, por 1h, à temperatura ambiente. Então, a membrana foi lavada cinco vezes com água salina (0,9%) e incubada com o conjugado anti-imunoglobulinas de camundongo marcado com peroxidase, em diluição de 1:1000 em tampão PBS, por 1h, à temperatura ambiente. Após cinco lavagens, a coloração foi revelada com DAB (0,5 mgmL^{-1}) (3, 3'-diaminobenzidina) e H_2O_2 30% (1,5 μLmL^{-1}). A reação foi interrompida pela lavagem sucessiva da membrana com água destilada.

2.7. Imunohistoquímica

Um exemplar de tambaqui infectado por *N. buttnerae* e outro exemplar não infectado tiveram seu intestino retirado e fixado em Bouin para análise imunohistoquímica. Os cortes histológicos de intestino foram parafinizados no Histotécnico Leica TP1020, cortadas com o Micrótomo Leica RM 2245 em 4 μm . O material sofreu desidratação em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 100%), diafanização em xilol e incluídos em Paraplast Plus (Sigma®) [25]. Cortes de 5 μm foram preparados em micrótomo RM LEICA 2245 e depositados em lâminas.

Em seguida, as lâminas foram desparafinizadas e reidratadas por uma sequência descendente em álcool etílico – 100°, 95°, 80°, 70° por cinco minutos cada. Então, procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena incubando as secções com uma solução contendo 1% de peróxido de hidrogênio diluído em PBS pelo período de 2h em cuba, em temperatura ambiente. Após este período o material foi lavado em solução de tampão fosfato salina (PBS) mais Triton X-100 [$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}$ ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$)_n] por duas vezes, sob agitação, durante 5 minutos em cada lavagem. Após a recuperação dos epítomos antigênicos as lâminas foram bloqueadas com leite desnatado 5% (Molico-Nestlé-SP) e tamponado com PBS.

Para a marcação das imunoglobulinas na mucosa de *C. macropomum* foi usada uma concentração de 1:300 μL do anticorpo policlonal de camundongo anti-imunoglobulinas totais séricas de tambaqui preparados conforme Sousa [24] sobre os cortes, diluído em solução de

PBS, em câmara úmida por um período de 12 horas (overnight) em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas com PBS e Triton X-100 (5 min/ lavagem). Então, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Thermo Fisher Scientific®) na concentração de 1:300 μ L diluído em PBS, em câmara úmida por 1 hora, seguidas de lavagem em PBS com Triton X-100.

Em ambiente escuro foi instilada uma gota do agente cromógeno 3'3 diaminobenzidina (DAB) e do substrato da peroxidase, a H_2O_2 , em cada secção, sendo imersas em água destilada e após 3 minutos observado a coloração da revelação. As lâminas foram banhadas em hematoxilina, rapidamente por 5 segundos, mergulhadas seguidamente em álcool absoluto e xilol, sendo conseguinte montadas com Permount® (Fisher Chemical). As reações positivas foram reconhecidas pela coloração vermelho amarronzadas e as negativas pela coloração em tons mais suaves de marrom amareladas. As melhores lâminas foram selecionadas e suas secções fotomicrografadas com a utilização de microscópio de luz convencional com câmera acoplada (LEICA DM500) para captura de imagens da reação, obtendo-se imagens dos vilos do intestino de tambaqui parasitado e não parasitado com *Neoechinorhynchus buttnerae*.

2.8. Análise parasitológica

Os parasitos presentes nos peixes infectados foram fixados em formol 5% e quantificados em estereomicroscópio. Com esses valores, foram calculados os índices parasitários de acordo com Bush et al. [26]. A prevalência (P) foi calculada com base na relação entre o número de hospedeiros parasitados, e o número de hospedeiros examinados, multiplicado por 100. A abundância média (AM) foi calculada como o número total de parasitas de uma determinada espécie na amostra, dividido pelo número total de hospedeiros analisados. A intensidade média (IM) foi calculada pelo número total de parasitos de uma determinada espécie em uma amostra, dividido pelo número de hospedeiros infectados por esta espécie.

2.9. Análise estatística

Quando atendidos os pressupostos de normalidade e homocedasticidade, a ANOVA *two-way* foi realizada para testar o efeito da condição (infectado ou não infectado) e das classes de peso sobre os níveis de alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, proteínas totais e imunoglobulinas totais presentes no soro e no muco dos animais. Os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e à homogeneidade da variância pelo teste de Levene. Dados não normais foram logaritimizados (log natural).

Os dados de proteínas totais no soro e de alanina aminotransferase no muco não atenderam aos pressupostos de normalidade e homocedasticidade para análise por ANOVA *two-way*. Portanto, esses dados foram analisados por teste *t* de Student não pareado, quando paramétricos, ou Mann-Whitney, quando não paramétricos, comparando animais nas condições infectados ou não infectados em diferentes pesos e animais na mesma classe de peso entre as condições. A comparação na taxa de infecção dos animais infectados nas classes 1 e 2 também foi feita por teste *t*.

O teste de correlação de Pearson foi usado para determinar a correlação entre as enzimas e proteínas totais presentes no soro e no muco de animais infectados e não infectados. Dados não normais foram correlacionados pelo coeficiente de correlação de Spearman. O nível de confiança considerado para todas as análises foi $p < 0,05$ para significância estatística [28]. As análises estatísticas foram realizadas usando o *R Statistical Software* [27].

3. Resultados

3.1. Análises enzimáticas e proteínas totais

A tabela 1 mostra os níveis de alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP) e proteínas totais (PTT) encontradas no soro e no muco de tambaqui. Não houve diferença entre os níveis de ALT encontrados no soro entre as classes de peso e entre as condições dos animais ($p > 0.05$), assim como no muco. Por outro lado, entre os tambaquis infectados e não infectados por *N. buttnerae* houve diferença nos níveis de fosfatase alcalina sérica ($p < 0.05$), sendo observado o aumento desta enzima no soro dos animais infectados. No entanto, não houve diferença nos níveis desta enzima entre os animais infectados e não infectados pertencentes à classe 2. No muco, observou-se menores níveis de ALP nos tambaquis infectados comparados aos não infectados ($p < 0.05$). Não houve diferença nos níveis dessa enzima entre as classes de peso dos tambaquis não infectados e infectados ($p > 0.05$).

As proteínas totais não apresentaram diferenças entre as classes de peso dos peixes não infectados no soro e no muco. Porém, nos peixes infectados foi possível observar maiores concentrações de proteínas totais séricas e diferenças entre as classes de peso ($p < 0.05$), sendo os peixes infectados na classe 2 os que apresentaram maiores níveis desse indicador. No muco, peixes infectados apresentaram maiores concentrações de proteínas totais comparados

aos peixes não infectados ($p < 0.05$), porém não houve diferença entre as classes de peso dos tambaquis nas mesmas condições (Tabela 1).

A correlação entre as enzimas e as concentrações de proteínas totais foi realizada considerando a variação desses parâmetros no soro ou no muco. Foi observada uma correlação negativa significativa entre os valores de ALT e proteínas totais no soro dos animais infectados e no muco ($p < 0.05$) desses animais (Tabela 2).

Tabela 2. Média \pm desvio padrão dos níveis de alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP) e proteínas totais (PTT) presentes no soro e no muco de tambaqui (*Colossoma macropomum*) não infectados e infectados por *Neoechinorhynchus buttnerae* em diferentes classes de peso.

Parâmetros		Não infectados		Infectados	
		Classe 1	Classe 2	Classe 1	Classe 2
Soro	ALT (U L ⁻¹)	26,83 \pm 16,4 ^a	40,1 \pm 21,54 ^a	27,3 \pm 15 ^a	21,34 \pm 12,5 ^a
	ALP (U L ⁻¹)	22,97 \pm 11,1 ^a	29,15 \pm 9 ^{ac}	49,4 \pm 9,4 ^b	42,9 \pm 21,5 ^{bc}
	PTT (g dL ⁻¹)	1,09 \pm 0,27 ^a	1,12 \pm 0,13 ^a	1,38 \pm 0,3 ^b	2,06 \pm 0,7 ^c
Muco	ALT (U L ⁻¹)	68,3 \pm 29,9 ^a	95,4 \pm 73 ^a	94,35 \pm 34,12 ^a	75,6 \pm 51,4 ^a
	ALP (U L ⁻¹)	441,1 \pm 48 ^a	434,5 \pm 78,9 ^a	354,7 \pm 89,7 ^b	293,3 \pm 105,4 ^b
	PTT (g dL ⁻¹)	0,27 \pm 0,07 ^a	0,35 \pm 0,11 ^a	0,46 \pm 0,35 ^b	0,5 \pm 0,22 ^b

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0.05$).

Tabela 3. Correlação entre diferentes parâmetros no soro e muco de tambaqui (*Colossoma macropomum*) não infectados e infectados por *Neoechinorhynchus buttnerae*.

Condição	Soro	Coefficiente	Muco	Coefficiente
Não infectados	ALT vs ALP	0.35	ALT vs ALP	0.09
	ALT vs PTT	0.12	ALT vs PTT	0.27
	ALP vs PTT	0.06	ALP vs PTT	0.00
Infectados	ALT vs ALP	-0.24	ALT vs ALP	0.22
	ALT vs PTT	-0.49*	ALT vs PTT	-0.56*
	ALP vs PTT	0.16	ALP vs PTT	-0.31

ALT = alanina aminotransferase; ALP = fosfatase alcalina; PTT = proteínas totais. * = correlação estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

imunoglobulinas no muco e na superfície corporal do acantocéfalo, indicando a interação dessas moléculas com o parasito (Figura 2).

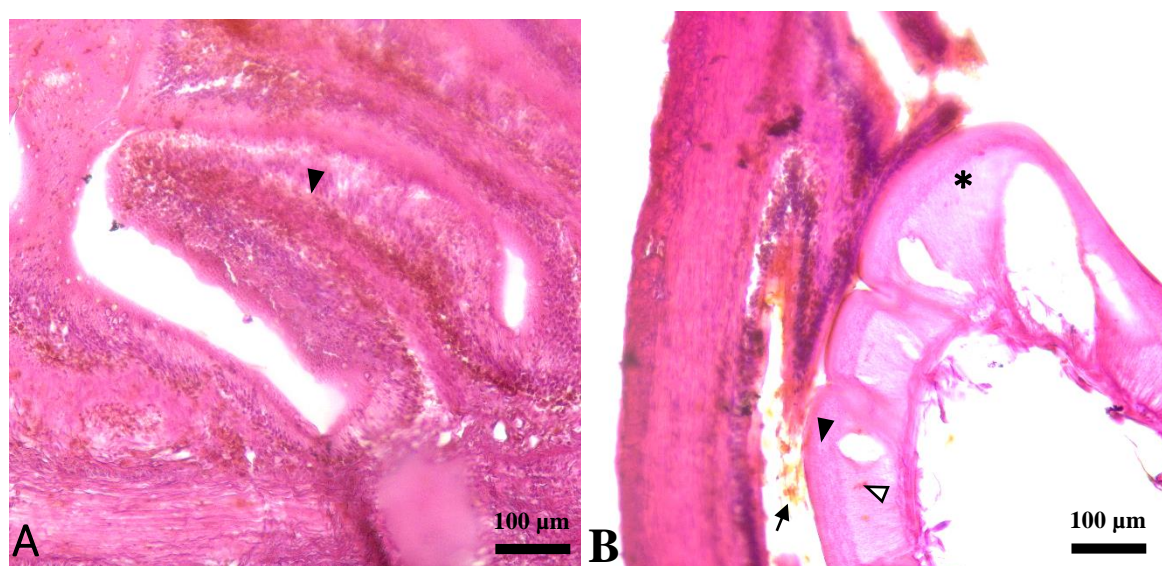


Figura 2. Comparação da reação na camada mucosa do intestino de *Colossoma macropomum* não infectado (A) e infectado por *Neoechinorhynchus buttnerae* (B) tratados com imunoglobulina de camundongo anti-imunoglobulinas de tambaqui. A coloração vermelha- amarronzada revela a presença de imunoglobulinas. **A.** Intestino não infectado apresentando vilo intacto e reação positiva nas células presentes na lâmina própria (cabeça de seta). **B.** Intestino infectado mostrando compressão do vilo pelo corpo do parasito (asterisco) e reação positiva nas células presentes na lâmina própria (cabeça de seta preta), no muco (seta fina) e na superfície corporal do acantocéfalo (cabeça de seta branca).

3.4. Análise parasitológica

Os índices parasitários (prevalência, intensidade média e abundância média), assim como os valores de mínimo e máximo de parasitos encontrados nos peixes da classe 1 e classe 2 são apresentados na tabela 3. Não houve diferença significativa nas taxas de infecção entre as classes de peso ($p > 0.05$).

Tabela 4. Índices parasitários de tambaqui (*Colossoma macropomum*) infectados por *Neoechinorhynchus buttnerae* em diferentes classes de peso.

Infectados	Prevalência	Intensidade média	Abundância média	Min - Max
Classe 1	100%	693.8 ± 420.5	693.8 ± 420.5	171 - 1389
Classe 2	100%	1020.3 ± 362.3	1020.3 ± 362.3	526 - 1540

4. Discussão

No ambiente natural, os peixes estão expostos ao contato com uma maior diversidade de agentes infecciosos, portanto, existe uma competitividade entre os próprios patógenos para a ocupação de determinados sítios no hospedeiro [29]. Em ambientes de confinamento, como nas pisciculturas, os registros de infecções estão geralmente associados a poucas espécies de patógenos que são encontrados em maior abundância [30]. Neste estudo, foram registradas altas taxas de infecção ($693,8 \pm 420,5$ e $1020,3 \pm 362,3$) por *N. buttnerae* em *C. macropomum*.

Todos os intestinos de tambaquis infectados analisados eram exclusivamente infectados por *N. buttnerae* e o valor mínimo e máximo encontrado por peixe foi 171 e 1540 parasitos, respectivamente. A intensidade de infecção observada neste estudo provavelmente foi favorecida pelo ambiente de confinamento, uma vez que a presença de hospedeiros intermediários facilita que o acantocéfalo *N. buttnerae* complete seu ciclo reprodutivo nos tanques de piscicultura e possa aumentar em abundância no hospedeiro, provavelmente por reinfecções sucessivas [18].

A infecção por parasitos intestinais pode resultar em alterações fisiológicas relacionadas à resposta imune dos hospedeiros aos danos causados pelo parasito [19,31]. A alanina aminotransferase é uma enzima indicadora de dano na função hepática e também está relacionada ao metabolismo de proteínas, podendo sofrer alterações em seus níveis séricos e teciduais principalmente quando os peixes são sujeitos a condições de toxicidade [32,33]. Em resposta a infecções intestinais, dependendo da patogenicidade do parasito, é observada uma alteração nos níveis de ALT sérica ou em órgãos como o fígado [34].

Em *Channa punctatus* infectado pelo nematódeo *Eustrongylides* sp. foi observado aumento nos níveis de ALT, ALP, assim como nos níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) [35]. Estas alterações também foram descritas para duas espécies de bagres (*Bagrus bayad* e *Bagrus docmak*) infectados simultaneamente por protozoários, nematódeos e cestódeos [36]. Nesses estudos, a alteração nos níveis de ALT foi decorrente dos danos causados pelos parasitos nos tecidos que infectam, havendo rupturas nas camadas do intestino e sendo observado hemorragias no fígado e no baço, além do aumento do metabolismo no fígado ocasionando lise de hepatócitos [35,36].

O *N. buttnerae* infecta o intestino do tambaqui, porém, a maior parte dos parasitos ficam livres no lúmen do intestino, enquanto a quantidade de parasitos que fixam a probóscide na

parede intestinal é proporcionalmente menor [16]. Quando há fixação da probóscide, pode-se observar danos mais severos conforme o grau de penetração do parasito [16,18]. No presente estudo, os tambaquis infectados não apresentaram diferenças nos níveis séricos ou no muco intestinal de ALT em relação aos tambaquis não infectados, mostrando que a infecção por acantocéfalo mesmo que intensa, como a relatada neste estudo, não teve efeito sobre esta enzima.

Em contrapartida, os níveis de fosfatase alcalina no soro aumentaram nos tambaquis infectados, podendo indicar algum dano na função hepática, uma vez que essa enzima é intracelular e a elevação de sua concentração no soro é geralmente em função do aumento da permeabilidade da membrana dos hepatócitos ou do rompimento dessas células [37]. Além disso, o aumento da fosfatase alcalina sérica também pode ser influenciado pela secreção dessa enzima na porção basolateral dos enterócitos, em resposta à infecção ou pela lise celular dos enterócitos causada pelos danos no epitélio intestinal, uma vez que uma parte da fosfatase alcalina sérica é proveniente do intestino [38].

A atividade imune da fosfatase alcalina intestinal está relacionada à manutenção da homeostase gastrointestinal, pois participa do controle da inflamação local, prevenindo a infiltração de neutrófilos [39]. Além disso, esta enzima participa da desfosforilação de substâncias endógenas pró-inflamatórias como adenosinas fosforiladas (ADP, ATP, AMP) liberadas decorrentes de alterações na integridade tecidual devido às infecções [37]. Assim, vários estudos relatam o aumento da atividade de fosfatase alcalina como consequência à infecção por helmintos [40]. Neste estudo, foi observada uma diminuição nos níveis de fosfatase alcalina no muco intestinal dos tambaquis infectados que pode ser consequência do dano causado pela fixação da probóscide do *N. buttnerae* ou pelo corpo do parasito no epitélio intestinal.

Aguiar et al. [16] descreveram os danos teciduais associados à infecção por *N. buttnerae*, relatando danos como compressão e descamação dos vilos quando os parasitos estavam livres no lúmen até o desaparecimento dos vilos quando havia fixação da probóscide do parasito na parede intestinal. A fosfatase alcalina intestinal é secretada no muco pela porção apical dos enterócitos [41], portanto, a alta taxa de infecção pode ter ocasionado danos ao longo de todo o epitélio intestinal. Como resultado, a secreção dessa enzima nas vilosidades pode ter sido reduzida, diminuindo a concentração de fosfatase alcalina no muco intestinal, favorecendo a intensa resposta inflamatória no intestino, como relatado na infecção por este parasito [17,18].

A proteína total sérica é frequentemente usada como um indicador do estado de saúde dos peixes [11,42]. Nos tambaquis infectados foi observada a elevação dos níveis de proteínas no soro e no muco. Os níveis de proteína total sérica podem ter aumentado nos animais infectados devido à maior produção de anticorpos e da elevação dos níveis de fosfatase alcalina nestes animais. A maior concentração de proteínas no muco intestinal dos animais infectados também pode ser em virtude da produção de outros fatores humorais secretados no muco, como apo-lipoproteínas e outras enzimas relacionadas à resposta imune à infecção, e secreções produzidas pelo próprio parasito [40,43,44].

No presente estudo, a elevação dos títulos de imunoglobulinas séricas totais no tambaqui em função da infecção demonstra a produção de anticorpos em resposta ao estímulo de um antígeno proveniente do parasito, ainda que as funções das imunoglobulinas produzidas não estejam elucidadas. Apesar dos altos títulos nos animais infectados, não foi constatado sinal de resistência à infecção ao se observar a heterogeneidade de tamanhos dos acantocéfalos, que indicava a ocorrência de reinfecções.

Alguns estudos caracterizando o repertório de imunoglobulinas secretado por linfócitos B de peixes teleósteos constataram uma grande diversidade de receptores e uma ampla resposta policlonal em resposta a infecção sistêmica [45,46]. Diferentes mecanismos podem estimular a resposta policlonal dos linfócitos B em peixes, incluindo ativação direta por moléculas mitogênicas oriundas do parasito ou a presença de substâncias tóxicas no ambiente [47].

Em salmonídeos, substâncias mitogênicas estimularam a proliferação de linfócitos B, sendo o aumento dos níveis de imunoglobulinas totais séricas mais relacionadas à ativação policlonal desses linfócitos do que a proliferação monoclonal [48]. Porém, se este estímulo tem efeitos benéficos ou deletérios para a efetividade da resposta imune na eliminação ou resistência aos parasitos ainda é uma questão em debate, uma vez que a resposta policlonal pode aumentar a probabilidade de reagir a um patógeno, mas também pode desencadear o desenvolvimento de uma doença autoimune [57].

Poucos trabalhos relataram a produção de anticorpos por peixes infectados por acantocéfalos [49,50]. Anticorpos específicos ao acantocéfalo *Neoechinorhynchus carpiodi* foram detectados em *Carpiodes cyprinus* [51]. Nesse estudo, a reação antígeno-anticorpo observada foi mais intensa nos parasitos adultos e não foi encontrada correlação entre os títulos de anticorpos e a intensidade da infecção.

Harris [52] relatou a produção de anticorpos por *Leuciscus cephalus* em resposta à infecção pelo acantocéfalo *Pomphorhynchus laevis*. Os anticorpos foram detectados por precipitação tanto no soro quanto no muco intestinal do peixe, apresentando reação antígeno-anticorpo somente quando parasitos adultos foram utilizados. Em ambos os trabalhos, não foi possível determinar a função dos anticorpos produzidos pelo peixe, porém, sugere-se que estes possam estar relacionados à sinalização celular ou neutralização de toxinas produzidas pelo parasito [52].

No muco de *C. macropomum* foram observadas diferenças entre os títulos de imunoglobulinas dos animais infectados e não infectados, sendo que os animais não infectados apresentaram títulos mais altos de anticorpos. Conforme revelado pela imunohistoquímica, as imunoglobulinas secretadas na mucosa intestinal estavam presentes no muco, mas também ligadas à superfície do *N. buttnerae*. Assim, propõe-se que os títulos de imunoglobulinas no muco intestinal dos tambaquis infectados e não infectados apresentaram diferenças significativas devido à agregação de uma parte das imunoglobulinas secretadas no corpo do parasito, o que diminuiria a detecção dessas moléculas solúveis no muco coletado. Por outro lado, pode também significar que a presença de níveis mais altos de imunoglobulinas no muco dos animais não infectados conferiu a estes animais alguma resistência à infecção.

Por meio da imunohistoquímica, há um indicativo de que o muco e o soro do tambaqui compartilham a mesma classe de imunoglobulina participando da resposta imune à infecção, uma vez que o anticorpo anti-imunoglobulinas de tambaqui totais séricas foi utilizado para o processo de revelação das imunoglobulinas na mucosa intestinal. Os resultados da imunohistoquímica também mostraram que provavelmente proteínas presentes na cutícula ou no tegumento do *N. buttnerae* possam ser a fonte imunogênica para a produção de anticorpos.

A função dessas imunoglobulinas na mucosa intestinal pode estar relacionada a sinalização para células efectoras frequentemente associadas à infecções por helmintos em teleósteos, principalmente, eosinófilos, mastócitos e células *rodlets* [8,53,54]. Em *Cyprinus* sp. e *Schizothorax* sp, os danos causados por acantocéfalos resultaram em eosinofilia na mucosa intestinal [55]. Essa resposta celular também já foi observada em *zebrafish* e é bem estabelecida para mamíferos, indicando uma conservação do papel de eosinófilos na resposta a antígenos ou infecções por helmintos [56]. Porém, as interações entre as imunoglobulinas na mucosa intestinal e a resposta celular associada ainda precisam ser elucidadas.

Este é o primeiro estudo reportando a titulação de anticorpos de *C. macropomum* e avaliando alterações de fatores humorais na resposta imune no soro e no muco intestinal em consequência da infecção por acantocéfalos. A resposta imune humoral do *C. macropomum* observada mostra que a infecção resulta na alteração local e sistêmica de componentes da imunidade inata e adaptativa do animal. A variação nos títulos de imunoglobulinas em resposta a presença do acantocéfalo no intestino indica o potencial antigênico deste parasito. Porém, a efetividade dessa resposta na eliminação ou resistência ao parasito, assim como possibilidades de imunização ainda precisam ser avaliadas.

5. Referências

- [1] C. J Secombes, T. Wang, The innate and adaptive immune system of fish, in: Infect. Dis. Aquac. Prev. Control, 2012: pp. 3–68. doi:10.1016/B978-0-85709-016-4.50001-5.
- [2] N. Cabillon, C. Lazado, Mucosal Barrier Functions of Fish under Changing Environmental Conditions, Fishes. 4 (2019) 2. doi:10.3390/fishes4010002.
- [3] B. Magnadóttir, Innate immunity of fish (overview), Fish Shellfish Immunol. 20 (2006) 137–151. doi:10.1016/j.fsi.2004.09.006.
- [4] G.D. Gómez, J.L. Balcázar, A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish: Table 1, FEMS Immunol. Med. Microbiol. 52 (2008) 145–154. doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00343.x.
- [5] B. Magnadottir, S. Lange, S. Gudmundsdottir, J. Børgwald, R.A. Dalmo, Ontogeny of humoral immune parameters in fish, Fish Shellfish Immunol. 19 (2005) 429–439. doi:10.1016/J.FSI.2005.03.010.
- [6] J. Ye, I.M. Kaattari, C. Ma, S. Kaattari, Fish & Shellfish Immunology The teleost humoral immune response, Fish Shellfish Immunol. 35 (2013) 1719–1728. doi:10.1016/j.fsi.2013.10.015.
- [7] S. Mashoof, M. Criscitiello, Fish Immunoglobulins, Biology (Basel). 5 (2016) 45. doi:10.3390/biology5040045.
- [8] B.S. Dezfuli, G. Bosi, J.A. DePasquale, M. Manera, L. Giari, Fish innate immunity against intestinal helminths, Fish Shellfish Immunol. 50 (2016) 274–287. doi:10.1016/j.fsi.2016.02.002.
- [9] J.H.W.M. Rombout, L. Abelli, S. Picchietti, G. Scapigliati, V. Kiron, Teleost intestinal

- immunology, Fish Shellfish Immunol. 31 (2011) 616–626. doi:10.1016/j.fsi.2010.09.001.
- [10] A. Rastiannasab, S. Afsharmanesh, R. Rahimi, I. Sharifian, Alternations in the liver enzymatic activity of Common carp, *Cyprinus carpio* in response to parasites, *Dactylogyrus* spp. and *Gyrodactylus* spp., J. Parasit. Dis. 40 (2016) 1146–1149. doi:10.1007/s12639-014-0638-9.
- [11] P. Yarahmadi, H. Ghafari Farsani, A. Khazaei, M. Khodadadi, G. Rashidiyan, M.A. Jalali, Protective effects of the prebiotic on the immunological indicators of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with *Aeromonas hydrophila*, Fish Shellfish Immunol. 54 (2016) 589–597. doi:10.1016/j.fsi.2016.05.010.
- [12] A. Assefa, F. Abunna, Maintenance of Fish Health in Aquaculture: Review of Epidemiological Approaches for Prevention and Control of Infectious Disease of Fish, Vet. Med. Int. 2018 (2018). doi:10.1155/2018/5432497.
- [13] B. Magnadottir, Immunological Control of Fish Diseases, Mar. Biotechnol. 12 (2010) 361–379. doi:10.1007/s10126-010-9279-x.
- [14] IBGE, Produção da Pecuária Municipal, Rio de Janeiro, 2017. <https://www.ibge.gov.br/%0Aestatisticas-novoportal/%0Aeconomicas/agricultura-epecuaria/9107-producao-dapecuaria-municipal.html>. Acessado em 26 de Junho de 2019.
- [15] E.C. Chagas, P.O. Maciel, S.L. Aquino-Pereira, Infecções por acantocéfalos: um problema para a produção de peixes, in: M. Tavares-Dias, W. dos S. Mariano (Eds.), Aquicultura No Bras. Novas Perspect., 1st ed., Pedro & João Editores, São Carlos, 2015: pp. 305–328.
- [16] L.S. Aguiar, M.I.B. de Oliveira, L.V. de Matos, A.L.S. Gomes, J.I. da Costa, G.S. da Silva, Distribution of the acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae* and semiquantitative analysis of histopathological damage in the intestine of tambaqui (*Colossoma macropomum*), Parasitol. Res. 117 (2018) 1689–1698. doi:10.1007/s00436-018-5840-8.
- [17] L. V De Matos, M. Inês, B. De Oliveira, A. Lúcia, S. Gomes, G.S. Da Silva, Morphological and histochemical changes associated with massive infection by *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) in the farmed

- freshwater fish *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 from the Amazon State, Brazil, *Parasitol Res* 116 (2017) 1029–1037. doi:10.1007/s00436-017-5384-3.
- [18] G.T. Jerônimo, S.B. de Pádua, M.A. de A. Belo, E.C. Chagas, S.R. Taboga, P.O. Maciel, M.L. Martins, *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala) infection in farmed *Colossoma macropomum*: A pathological approach, *Aquaculture*. 469 (2017) 124–127. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.11.027.
- [19] M.J.S. Rocha, G.T. Jerônimo, O.T.F. da Costa, J.C. de O. Malta, M.L. Martins, P.O. Maciel, E.C. Chagas, Changes in hematological and biochemical parameters of tambaqui (*Colossoma macropomum*) parasitized by metazoan species, *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária*. 27 (2018) 488–494. doi:10.1590/s1984-296120180073.
- [20] F. Koroleff, Determination of nutrients., in: K. (Ed. . GRASSHOF (Ed.), *Methods Seawater Anal.*, Verlag Chemie, Weinheim, 1976: pp. 117–181.
- [21] H. Cordero, A. Cuesta, J. Meseguer, M.Á. Esteban, Changes in the levels of humoral immune activities after storage of gilthead seabream (*Sparus aurata*) skin mucus, *Fish Shellfish Immunol*. 58 (2016) 500–507. doi:10.1016/J.FSI.2016.09.059.
- [22] O. Sanchooli, A.H. Moradloo, R. Ghorbani, Measurement of Alkaline Phosphatase and Lysozyme Enzymes in Epidermal Mucus of Different Weights of *Cyprinus carpio*, *World J. Fish Mar. Sci*. 4 (2012) 521–524. doi:10.5829/idosi.wjfm.2012.04.05.64202.
- [23] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent*, n.d. <http://www.jbc.org/> (accessed August 3, 2019).
- [24] R.L. de Sousa, Desenvolvimento de uma *startup* e de ferramentas para diagnóstico de doenças endêmicas de tambaqui (*Colossoma macropomum*), Universidade Federal do Amazonas, 2019.
- [25] V. Maia, Técnica histológica, Atheneu, São Paulo, Brazil, 1979.
- [26] A.O. Bush, K.D. Lafferty, J.M. Lotz, A.W. Shostak, Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited, *J. Parasitol.* (1997) 575–583.
- [27] R.C. Team, R: A language and environment for statistical computing, (2013).
- [28] J.H. Zar, Biostatistical analysis, 5th ed., Pearson Education India, New Jersey, 1999.
- [29] G. Salgado-Maldonado, E.F. Mendoza-Franco, J.M. Caspeta-Mandujano, C. Ramírez-Martínez, Aggregation and negative interactions in low-diversity and unsaturated

- monogenean (Platyhelminthes) communities in *Astyanax aeneus* (Teleostei) populations in a neotropical river of Mexico, *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 8 (2019) 203–215. doi:10.1016/j.ijppaw.2019.02.005.
- [30] W.X. Li, H. Zou, S.G. Wu, F. Xiong, M. Li, X.R. Ma, D.J. Marcogliese, S.A. Locke, G.T. Wang, Composition and diversity of communities of *Dactylogyrus* spp. in wild and farmed goldfish *Carassius auratus*, *J. Parasitol.* 104 (2018) 353–358. doi:10.1645/16-192.
- [31] F. Panjvini, S. Abarghuei, H. Khara, H.M. Parashkoh, Parasitic infection alters haematology and immunity parameters of common carp, *Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758, *J. Parasit. Dis.* 40 (2016) 1540–1543. doi:10.1007/s12639-015-0723-8.
- [32] J.V. Rao, Biochemical alterations in euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus* exposed to sub-lethal concentrations of an organophosphorus insecticide, monocrotophos, *Chemosphere.* 65 (2006) 1814–1820. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2006.04.015.
- [33] I. Bhat, S.A. Dar, V. Nautiyal, V. Phulia, I.A. Bhat, P. Srivastava, N.P. Sahu, S. Gupta, Determination of benzimidazoles in fish plasma by chromatographic method and their effects on metabolic and antioxidative enzymes activity, *Aquaculture* 486 (2017) 57–63. doi:10.1016/j.aquaculture.2017.11.001.
- [34] O. Slavík, P. Horký, K. Douda, J. Velíšek, J. Kolářová, P. Lepič, Parasite-induced increases in the energy costs of movement of host freshwater fish, *Physiol. Behav.* 171 (2017) 127–134. doi:10.1016/J.PHYSBEH.2017.01.010.
- [35] I. Kundu, P.K. Bandyopadhyay, D.R. Mandal, G. Gurelli, Study of Pathophysiological Effects of the Nematode Parasite *Eustrongylides* sp. on Freshwater Fish *Channa punctatus* by Hematology, Serum Biochemical, and Histological Studies, *Turkish J. Parasitol.* 40 (2016) 42–47. doi:10.5152/tpd.2016.4551.
- [36] Omeji S, A. Ja, G. Aa, Impact of parasites on the haematological and biochemical parameters of selected bagrid species from lower river Benue Nigeria, *Int. J. Vet. Sci. Anim. Husb.* 3 (2018) 23–27.
- [37] J.-P. Lallès, Biology, environmental and nutritional modulation of skin mucus alkaline phosphatase in fish: A review, *Fish Shellfish Immunol.* 89 (2019) 179–186. doi:10.1016/J.FSI.2019.03.053.

- [38] J. Lallès, Intestinal alkaline phosphatase in the gastrointestinal tract of fish: biology, ontogeny, and environmental and nutritional modulation, *Rev. Aquac.* (2019) raq.12340. doi:10.1111/raq.12340.
- [39] J.M. Bates, J. Akerlund, E. Mittge, K. Guillemin, Intestinal Alkaline Phosphatase Detoxifies Lipopolysaccharide and Prevents Inflammation in Zebrafish in Response to the Gut Microbiota, *Cell Host Microbe*. 2 (2007) 371–382. doi:10.1016/j.chom.2007.10.010.
- [40] N. Kaur, R. Kumar, D. Kamilya, Modulation of systemic and mucosal immune responses of *Catla catla* (Hamilton, 1822) experimentally challenged with gill monogeneans, *Fish Shellfish Immunol.* 74 (2018) 567–572. doi:10.1016/J.FSI.2018.01.026.
- [41] J.-P. Lallès, Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects, (2013). doi:10.1111/nure.12082.
- [42] S. Kumar, R.P. Raman, K. Kumar, P.K. Pandey, N. Kumar, B. Mallesh, S. Mohanty, A. Kumar, Effect of azadirachtin on haematological and biochemical parameters of Argulus-infested goldfish *Carassius auratus* (Linn. 1758), *Fish Physiol. Biochem.* 39 (2013) 733–747. doi:10.1007/s10695-012-9736-8.
- [43] F. Villarroel, A. Bastías, A. Casado, R. Amthauer, M.I. Concha, Apolipoprotein A-I, an antimicrobial protein in *Oncorhynchus mykiss*: Evaluation of its expression in primary defence barriers and plasma levels in sick and healthy fish, *Fish Shellfish Immunol.* 23 (2007) 197–209. doi:10.1016/J.FSI.2006.10.008.
- [44] Q.Z.M. Bahloul, A. Skovgaard, P.W. Kania, K. Buchmann, Effects of excretory/secretory products from *Anisakis simplex* (Nematoda) on immune gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Fish Shellfish Immunol.* 35 (2013) 734–739.
- [45] R. Castro, L. Jouneau, H.-P. Pham, O. Bouchez, V. Ronique Giudicelli, M.-P. Lefranc, E. Quillet, A. Benmansour, F. Dé, R. Cazals, A. Six, S. Fillatreau, O. Sunyer, P. Boudinot, Teleost Fish Mount Complex Clonal IgM and IgT Responses in Spleen upon Systemic Viral Infection, *PLoS Pathogens* 9 (2013). doi:10.1371/journal.ppat.1003098.
- [46] M.M.D. Peñaranda, I. Jensen, L.G. Tollersrud, J.-A. Bruun, J.B. Jørgensen, Profiling the Atlantic Salmon IgM+ B Cell Surface Proteome: Novel Information on Teleost

- Fish B Cell Protein Repertoire and Identification of Potential B Cell Markers, *Front. Immunol.* 10 (2019) 37. doi:10.3389/fimmu.2019.00037.
- [47] P.-M.M. Schuwerack", J.W. Lewis, D. Hoole, N.J. Morley, Ammonia-induced cellular and immunological changes in juvenile *Cyprinus carpio* infected with the blood fluke *Sanguinicola inermis*, *Parasitology* 122 (2001) 339-345.
- [48] S.L. Kaattari, M.A. Yui, Polyclonal activation of salmonid B lymphocytes, *Dev. Comp. Immunol.* 11 (1987) 155–165. doi:10.1016/0145-305X(87)90017-6.
- [49] R. Hamers, H. Taraschewski, J. Lehmann, D. Mock, In vitro study on the impact of fish sera on the survival and fine structure of the eel-pathogenic acanthocephalan *Paratenuisentis ambiguus*, *Parasitol Res* 77 (1991) 703-708.
- [50] S. Nazir, M. Niamat Ali, M.Z. Chishti, Purification and Characterization of *Pomphorhynchus kashmirensis* Somatic Antigens Collected from Naturally Infected Local Fish *Schizothorax*, *NY Sci. J.* 6 (2013) 24-28.
- [51] A.J. Szalai, G. V. Danell, T.A. Dick, Intestinal Leakage and Precipitating Antibodies in the Serum of Quillback, *Carpiodes cyprinus* (Lesueur), Infected with *Neoechinorhynchus carpiodi* Dechtiar, 1968 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae), *J. Parasitol.* 74 (1988) 415. doi:10.2307/3282048.
- [52] J.E. Harris, The immune response of a Cyprinid fish to infections of the acanthocephalan *Pomphorhynchus laevis*, *Int. J. Parasitol.* 2 (1972) 459–469. doi:10.1016/0020-7519(72)90091-4.
- [53] B.S. Dezfuli, A. Lui, F. Pironi, M. Manera, A.P. Shinn, M. Lorenzoni, Cell types and structures involved in tench, *Tinca tinca* (L.), defence mechanisms against a systemic digenean infection, *J. Fish Dis.* 36 (2013) 577–585.
- [54] B.S. Dezfuli, T. Bo, M. Lorenzoni, A.P. Shinn, L. Giari, Fine structure and cellular responses at the host–parasite interface in a range of fish–helminth systems, *Vet. Parasitol.* 208 (2015) 272–279.
- [55] A.W. Shah, M. Parveen, S.H. Mir, S.G. Sarwar, A.R. Yousuf, Impact of helminth parasitism on fish haematology of Anchar Lake, Kashmir, Pakistan *J. Nutr.* 8 (2009) 42–45.
- [56] K.M. Balla, G. Lugo-Villarino, J.M. Spitsbergen, D.L. Stachura, Y. Hu, K. Banuelos, O. Romo-Fewell, R. V Aroian, D. Traver, Eosinophils in the zebrafish: prospective

- isolation, characterization, and eosinophilia induction by helminth determinants, *Blood*. 116 (2010) 3944–3954. doi:10.1182/blood-2010-03-267419.
- [57] R. Dziarski, Autoimmunity: polyclonal activation or antigen induction?, *Immunol. Today*. 9 (1998) 340-342. doi:10.1016/0167-5699(88)91333-3.

CONCLUSÃO GERAL

Na resposta dos peixes teleósteos à infecção por helmintos, o aumento no número e tamanho das células produtoras de muco possui papel fundamental na proteção das mucosas dos danos mecânicos que o parasito pode causar, além de conter componentes imunes que podem danificar o tegumento ou alterar o metabolismo do parasito. As células *rodlet* e os mastócitos, acompanhados por neutrófilos e macrófagos, são os principais tipos de células descritas em infecções causadas por todos os grupos de helmintos. A participação do sistema imune adaptativo na eliminação de parasitas e na aquisição de resistência contra futuras infecções (memória imunológica) ainda é um campo a ser elucidado, principalmente considerando a variabilidade inter/intraespecífica observada na expressão dessa resposta.

Nesse sentido, mostrou-se que a purificação de imunoglobulinas no tambaqui pode ser realizada pelo método do ácido caprílico como etapa inicial para o isolamento das imunoglobulinas (Ig). A classe de Ig isolada apresentou massa molecular semelhante a IgM já descrita para outros teleósteos, sendo uma classe presente no soro e no muco dessa espécie. A presença do acantocéfalo estimulou o aumento da expressão de imunoglobulinas na mucosa intestinal de tambaqui, observando-se maiores títulos de imunoglobulinas nos animais infectados. Foi possível observar que o muco também agrega as imunoglobulinas produzidas e secretadas, reforçando a importância desse fluido na resposta imune inata e adaptativa às infecções por parasitos. Além da expressão de imunoglobulinas no muco, também se constatou a alteração de determinados parâmetros na mucosa intestinal e no soro de tambaqui devido a infecção por acantocéfalos. As alterações nos níveis de fosfatase alcalina, imunoglobulinas e proteínas totais no soro e no muco intestinal mostra a influência da infecção sobre resposta imune inata e sistêmica do tambaqui.

Considerando o conhecimento presente na literatura, este é um estudo pioneiro na investigação da resposta imune adaptativa do tambaqui. Espera-se possibilitar novas abordagens na pesquisa e na inovação tecnológica quanto ao desenvolvimento e avaliação de diagnósticos, imunoestimulantes e medidas profiláticas. Ainda há muito que se conhecer sobre participação da resposta imune humoral do tambaqui na eliminação ou em conferir resistência a infecções assim como possibilidades de imunização, mas, este estudo espera contribuir com o conhecimento da biologia da espécie e na busca de soluções para os problemas enfrentados no setor produtivo.